

FRAKTIONIERUNG UND CHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG
VON CHROMOSOMALEN PROTEINEN AUS LAKTIERENDEM
KUHEUTER

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des
Fachbereichs Chemie
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Christian Krüger
aus Berlin

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548818_0094

FRAKTIONIERUNG UND CHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG
VON CHROMOSOMALEN PROTEINEN AUS LAKTIERENDEM
KUHEUTER

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des
Fachbereichs Chemie
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Christian Krüger
aus Berlin



1.Gutachter: Priv.Doiz.Dr. K.Pollow

2.Gutachter: Prof. Dr.G.Manecke

Tag der mündlichen Prüfung:5.10.1976

Tag der Promotion:

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
1. <u>Einleitung</u>	1
1.1. Bestandteile des Chromosoms	2
1.1.1. Histone	2
1.1.2. Nichthistone	3
1.2. Chromosomenpackung	3
1.3. Ziel der Arbeit	4
1.4. Wahl des Ausgangsmaterials	6
2. <u>Material und Methoden</u>	7
2.1. Chemikalien	7
2.2. Gewebe	8
2.3. Apparate	8
2.4. Zellkernisolierung nach Blobel und Potter	20
2.5. Chromatinpräparation	21
2.5.1. Informoferenwaschung	21
2.5.2. Lyse der Inneren Kernmembran	22
2.5.3. Chromatinabbau mit DNase	22
2.6. Dissoziation des Chromatins	23
2.6.1. 0,35 M Guanidiniumhydrochlorid- Dissoziation	23
2.7. Histonabtrennung durch Bio-Rex 70 Ionenaustauscher-Chromatographie	24
2.8. Aufbereitung der von Bio-Rex 70 nicht adsorbierten NHC-Proteine	25
2.9. Präparative isoelektrische Fokussie- rung mit dem Zonen-Konvektions-Elektro- fokussierapparat nach Valmet	25
2.9.2. Präparative isoelektrische Fokus- sierung in der LKB-Säule	26

	<u>Seite</u>
2.10. <u>Gelelektrophoresen</u>	27
2.10.1. Mikrogelelektrophorese nach V. Neuhoff	27
2.10.1.1. Reinigung von Mikrokapillaren	27
2.10.1.2. Herstellung von Mikrogelgradienten für ein SDS-Puffersystem	27
2.10.1.3. SDS-Inkubation und Gelelektrophorese der chromosomalen Proteine	28
2.10.1.4. Mikrogradienten-Gelelektrophorese- Systeme ohne ionisches Detergens	30
2.10.1.4.1. Basische Puffersysteme nach D.I. Wolfrum	30
2.10.1.4.2. Saures Puffersystem nach D.I. Wolfrum	30
2.10.1.4.3. Modifiziertes Elektrophoresepuffer- system nach R. Lim und E. Tadayyon	31
2.10.1.5. Isoelektrische Fokussierung im Mikro- gel nach V. Neuhoff	32
2.10.1.6. Mikrogelelektrophorese im homogenen, 6,4 %igen Acrylamidgel	33
2.10.1.7. Mikroelektrophorese im Flachgel	34
2.10.2. <u>Makrogelelektrophoresen</u>	34
2.10.2.1. Elektrophoresepuffersysteme für Histone	34
2.10.2.2. Fluoreszenzmarkierung von chromoso- malen Proteinen	35
2.10.2.3. SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli	35
2.10.2.3.1. Anfärben der Makrogele	36
2.10.2.3.1. Molekulargewichtsbestimmung der NHC-Proteine im Makrogel	36
2.10.2.4. 2 D nach A.R. Subramanian	36
2.10.2.5. 2 D in der Yeda-Apparatur	37
2.10.2.6. 2 D Gelelektrophorese in der DESAGA- Apparatur	38

	<u>Seite</u>
2.10.3. Aminosäureanalyse	38
2.10.4. Protein-, DNS-, RNS-Bestimmungen	39
2.10.5. Elektronenmikroskopie	40
3. <u>Ergebnisse</u>	43
3.1. Zellkernisolierung	43
3.2. Chromatinisolierung	43
3.3. Chromatindissoziation	46
3.4. Präparative und analytische Darstellung der Histonfraktionen	49
3.4.1. Präparative und analytische Darstellung der NHC-Fraktionen	55
3.4.2. Relative NHC-Proteinmengen des Kuheuterchromatins	55
3.4.3. Präparative Darstellung der Hühnerembryonenmuskel- und Kalbsthymus-NHC-Proteine in der LKB-Säule	57
3.4.4. Präparative Darstellung der Kuheuter-NHC-Proteine in der Valmet-Fokussierapparatur	61
3.4.5. 2 D von NHC-Proteinen	65
3.4.6. SDS-Gelelektrophorese der Kuheuter-NHC-Proteinfraktionen im Makrogel	66
3.4.7. Mikrogradientengelelektrophorese	66
3.4.8. Elektrophoresepuffersysteme für NHC-Proteine	76
3.4.9. Aminosäureanalyse	76
4. <u>Diskussion</u>	79
4.1. Theorie der NHC-Proteinfunktionen	85
5. <u>Zusammenfassung</u>	88
6. Literaturverzeichnis	90

Abkürzungen

NHC-Proteine:

Nichthistonchromatinproteine

DNS:

Desoxyribonucleinsäure

RNS:

Ribonucleinsäure

0,35 M Gua.-dissoziiert:

NHC-Proteine, die nach der Vorschrift von Abschnitt 2.6.1.
im Methodenteil dissoziiert wurden

3 M NaCl dissoziiert:

NHC-Proteine, die nach der Vorschrift von Abschnitt 2.6.2.
im Methodenteil dissoziiert wurden

0,35 M Gua.-Histonfraktion:

stark basische, chromosomale Proteinfraction, die nach der
Vorschrift von Abschnitt 2.6.2. und 2.7. im Methodenteil
aufgearbeitet wurde

EDTA:

Äthylendiamintetraessigsäure

2 D:

zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese

SDS:

Natriumdodecylsulfat

IP:

Isoelektrischer Punkt

Bis:

N,N'-Methylenbisacrylamid

TEMED:

N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin

Tris:

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

BIS-TRIS:

(bis(2-Hydroxyäthyl)imino-tris(Hydroxy-methyl)methan)

MES:

2(N-Morpholino)äthan-Sulfonsäure

hn-RNS:

heterogene Kern-RNS

RNP-Partikel:

Ribonukleoproteinpartikel

DMSO:

Dimethylsulfoxid

O.D.:

Optische Dichte

Fr.:

Fraktionen

1. Einführung

Sowohl Prokaryonten- als auch Eukaryontenchromosomen bestehen aus einer Doppelstranghelix-DNS, jedoch ist das gesamte Genom von Eukaryonten ca. 100- bis 10.000-mal größer als das von E.-coll. Die Zahl der Gene von Eukaryonten ist von Müller zwischen 5.000 und 50.000 geschätzt worden (1). Bei einem Molekulargewicht der Rinder-DNS von 2×10^{12} Dalton (2) kann nur ein kleiner Teil des Gesamtgenoms aus Protein-kodierenden Sequenzen bestehen. Ein großer Teil der DNS hat regulatorische Funktion. Es ist eine allgemein akzeptierte Hypothese, daß ein Chromomer einem Gen entspricht (40) bzw. einer Transkriptionseinheit (41), die generell eine Strukturgensequenz und mehrere regulatorische Sequenzen enthält (83). Als Wechselwirkungspartner von den regulatorischen Sequenzen werden NHC-Proteine angenommen (3,4,5).

Für Prokaryonten ist die Genregulation durch das Jacob-Monod-Modell erklärt worden (6). Im Falle des Lac-Operators von E.-coll werden ca. 10 Moleküle Lac-Repressor pro Zelle produziert, die dann 24 regulatorische Doppelstrangsequenzen aus ca. 3 Millionen herausfinden (7,8,9,10). Es ist anzunehmen, daß eine ähnliche Protein-Nukleinsäure-Wechselwirkung verantwortlich ist für die Regulation des Eukaryontengenoms.

Während der Entwicklung höherer Organismen wird eine große Zahl verschiedener Zelltypen mit unterschiedlichen chemisch-physikalischen Eigenschaften gebildet. Die Probleme der Entwicklung und Differenzierung von Zellen, des malignen Wachstums, des Wirkungsmechanismus mancher Hormone werden auf molekularbiologischer Ebene transformiert in die Fragestellung: In welcher zeitlich-räumlichen Reihenfolge geschieht die Aktivierung bzw. Inaktivierung des Gesamtgenoms von

höherentwickelten Organismen, welche Teile der DNS werden in einem bestimmten Differenzierungsstadium in RNS transkribiert? Die Regulation der Chromatinaktivität wird den NHC-Proteinen zugeschrieben (11).

Die verschiedenen Zellaffinitäten, die verantwortlich sind für die Ausbildung suprazellulärer Ordnungsmuster, sollen gleichfalls zurückführbar sein auf die Regulation der Gene (12,13).

1.1. Bestandteile des Chromosoms

Das durch biochemische Methoden isolierte Chromosomenmaterial von Eukaryonten nennt man Chromatin (14). Während das Bakterienchromosom hauptsächlich aus nackter DNS und einer kleinen Anzahl kurzfristig assoziierter Proteine besteht, besitzt das Eukaryontenchromosom permanent ein- bis zweimal soviel Protein wie DNS. Es gibt zwei Klassen von Proteinen: die Histone und die Nichthistone.

1.1.1. Histone

Die stark basischen Histone sind an der Nukleosomenstruktur des Chromatins beteiligt und verantwortlich für die Ausbildung der DNS-Superhelix (15,79,85). Im Gegensatz zu den NHC-Regulatorproteinen haben die Histone eine relativ geringe Affinität zu einer bestimmten Basensequenz. In vitro Versuche von J. Paul zeigen, daß die Histone völlig unspezifisch die Transkription inhibieren (18).

1.1.2. Nichthistone

Unter Nichthistonen versteht man alle mit Chromatin assoziierten Eiweißkörper, die nicht den Histonen oder Protaminen zugeordnet werden können. Die NHC-Proteinfraktionen sollen enthalten:

1. Enzyme des Chromosomenstoffwechsels:

DNS- (19) und RNS- (20) Polymerasen, Histonmodifikationsenzyme (21), Processing-Enzyme (22), Proteasen (16) und Kinasen (23).

2. Proteine, die für die verschiedenen Chromatinstrukturen verantwortlich sind (Eu- und Heterochromatin, "Transcription Loop"). Hierzu sollen nukleostatische Proteine (24), kontraktile Proteine (78), ω -Proteine (25), die superhelikale DNS entwinden, und saure NHC-Proteine und Phosphorproteine (26,4,80) gehören.

3. Aktivator-Repressor-Proteine. Hinweise dafür, daß NHC-Proteine eine positive und spezifische Kontrolle über die RNS-Synthese ausüben, gehen aus Versuchen von Gilmour und Paul (27), Benjamin und Goodnam (28), Kamiyama und Wang (29), Allfrey et al. (30), Teng et al. (17), Spelsberg et al (31), Baserga und Stein (32), Kamiyama et al. (33), Kostraba und Wang (34), Stein et al. (35), Rickwood et al. (36), Shea und Kleinsmith (37), und Stein et al. (81) hervor.

1.2. Chromosomenpackung

Obwohl Pflanzen und Tiere vor ca. 10^9 Jahren phylogenetisch divergierten, ist die Nukleosomenstruktur in beiden die gleiche (82). Die Eigenschaften eines lebenden Eukaryonten-

chromosoms sind charakterisiert durch graduell-konstante Übergangszustände einer DNS-Protein-Makromolekülkonfiguration in die andere. Der Nukleoproteinkomplex kann in zwei extremen Packungsarten bzw. den gemischten Formen von beiden vorliegen: einerseits in Form einer Superhelix nach dem Modell von S. Bram et al. (15), andererseits in stärker gestreckten Konfigurationen (38). Sowohl Histone als auch NHC-Proteine sind für die definierte Packungsart verantwortlich (38). Die Ultrafeinstruktur dieses Nukleoproteinkomplexes im Interphase- und Metaphasestadium, im Meiose- oder Mitosestadium, in den verschiedenen Geweben, im transkriptionsaktiven und im transkriptionsinaktiven Stadium ist charakterisiert durch die Menge und die Verschiedenartigkeit von NHC-Proteinen (38,33).

1.3. Ziel der Arbeit

In den verschiedenen Organen der Maus werden zwischen 2 % und 12 % der Einzelkopie-DNS-Sequenzen transkribiert (43); in der Rinderleber sind es ca. 5 % (44).

Bei einem durchschnittlichen Molekulargewicht der hn-RNS von ca. 7×10^6 und einer Sequenzkomplexität der Rinderleber-RNS von 8×10^7 (44) müßten ca. 4×10^3 verschiedene Loci auf der Transkriptionsebene spezifiziert werden. Größenordnungsmäßig müßten in den adulten Wirbeltierorganen zwischen 10^3 und 10^4 verschiedene Gen Loci durch NHC-Proteine vermittelt werden (5). Wieviel NHC-Proteine 10^3 bis 10^4 Gen Loci bestimmen, ist völlig unbekannt. Eine Entscheidung darüber, ob die Genaktivität von Eukaryonten nach dem Modell von J. Paul (4), G.P. Georgiev et al. (42), E. H. Davidson und R. J. Britten (5) reguliert

wird, hängt u.a. von der Heterogenität der NHC-Proteine und damit von der hochauflösenden analytischen Darstellung und der chemischen Charakterisierung der NHC-Proteine ab.

Die Ergebnisse von D. Rickwood und A.J. Mac Gillivray (86) zeigen, daß die phosphorylierten und nicht-phosphorylierten NHC-Proteine in den verschiedenen Mausgeweben sehr ähnlich sind. Mehr als die Hälfte der NHC-Proteinmasse soll aus 12 bis 18 Polypeptiden bestehen (87,88). 3 - 4 Polypeptide sollen ca. 10^6 mal im haploiden Genom vorhanden sein (89). Das offensichtliche Fehlen einer großen Anzahl von NHC-Proteinen bedeutet wahrscheinlich, daß hauptsächlich nur NHC-Proteine mit strukturbildender Funktion nachgewiesen wurden (78) und wegen der geringen Konzentration von Genregulatorproteinen im Zellkern (0,02 % - 0,2 % von gesamten NHC-Proteinen) (84) die Fraktionierungsmethoden nicht ausreichten, um die tatsächliche Heterogenität von den gesamten NHC-Proteinen nachzuweisen.

Die höchste NHC-Proteinfraktionierung wurde bisher erreicht von I. Bekhor und Mitarbeitern (46) durch stufenweise NaCl-Harnstoff-Chromatin-Dissoziation und anschließende SDS-Acrylamidgelelektrophorese. 94 NHC-Protein Komponenten verschiedener Mobilität konnten gegenüber 28 Banden von nicht vorfraktionierten NHC-Proteinen analytisch dargestellt werden.

SDS-Gelelektrophoresen von den gesamten NHC-Proteinen in einem Gel, wie sie von Elgin et al. (47), Le Stourgeon et al. (48) und Sanders (49) durchgeführt wurden, zeigen ein zu geringes Auflösungsvermögen im Verhältnis zur Vielzahl der Proteinbanden (84) und die Hauptbanden aus den verschiedenen Geweben innerhalb einer bestimmten Species sind identisch.

Wie kürzlich nachgewiesen werden konnte, bestehen einige der Hauptbanden aus den kontraktile Proteinen Actin, Myosin und Tropomyosin (119,120), die wahrscheinlich ihre Funktion im Nukleoplasma erfüllen.

Niemand kennt bisher die wirkliche Heterogenität von NHC-Proteinen, niemand kennt bisher ein eukaryontisches Genregulatorprotein. Deshalb sollen in dieser Arbeit sensitive Nachweistechiken für NHC-Proteine entwickelt werden.

Um eine Aussage machen zu können über die Vielzahl von NHC-Proteinen und über deren chemische Eigenschaften, ist es das Ziel der vorliegenden Arbeit solche analytischen Trennmethode zu entwickeln, die die NHC-Proteine fraktionieren sowohl durch differentielle Dissoziation des Chromatins als auch nach dem isoelektrischen Punkt und dem Molekulargewicht der NHC-Proteine.

Die zu erwartende NHC-Proteinmenge von den Einzelkomponenten ist gering; deshalb sollte die analytische Darstellung der NHC-Proteine nach Möglichkeit mit Mikromethode erfolgen.

1.6. Wahl des Ausgangsmaterials

Laktierendes Kuheutergewebe wurde als Ausgangsmaterial gewählt, weil es in relativ großer Menge ein Proteinsynthese-aktives Chromatin liefert.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Chemikalien folgender Firmen wurden benutzt:

- Bio-Rad, München:
Bio-Rex 70 (Natriumform 100 - 200 mesh; 10,2 mval);
- Boehringer, Mannheim:
Eichproteine (Combithek), Desoxyribonuclease I
(Kat.-Nr. 15469);
- Fluka, Neu-Ulm:
Acrylsäure, purum;
- Gurr Ltd., London:
Pyronin A;
- LKB, Bromma/Schweden:
Ampholine, pH 3 - 10;
- Merck, Darmstadt:
Saccharose für Dichtegradientenzentrifugation; Guanidini-
umhydrochlorid (für biochemische Zwecke); Tris(hydroxy-
methyl)-aminomethan, p.A.; Harnstoff, p.A. (wurde über
Amberlite- und Dowex-Ionenaustauscher-Harz gereinigt);
Äthylendinitrioltetraessigsäure, p.A.; Diglintonin;
- Serva, Heidelberg:
Riboflavin, (pharm.); Natriumdodecylsulfat, reinst (um-
kristallisiert aus Alkohol); Tween 20, rein; Dithio-
erythrit, rein; Amberlite- und Dowex-Ionenaustauscher-
Harz; Triton-X-100; Acrylamid, (umkristallisiert aus
Chloroform, 70 g/l); N,N'-Methylenbisacrylamid, (um-
kristallisiert aus Aceton, 10 g/l); N,N,N',N'-Tetra-
methylen-diamin, rein; Coomassie Brilliant Blue R-250;
Thioglycolsäure, p.A.; 80 % Fluram, p.A.;
- SIGMA, St. Louis/USA:
BIS-TRIS (bis(2-Hydroxyäthyl)imino-tris(Hydroxy-methyl)
methan); MES (2(N-Morpholino)äthan Sulfonsäure);

Brij 35 (Polyoxyäthylenauryäther); Lubrol PX_R (Polyoxyäthylenalcohol).

Alle übrigen Chemikalien wiesen den Reinheitsgrad pro analysi auf.

2.2. Gewebe

Kuheuter von der Kuh Nr. 942 aus der 18. Laktationswoche aus dem Max-Planck-Institut für Tierzucht und Tierernährung, 2061 Trenthorst/Bad Oldesloe, diente als Ausgangsmaterial. Für die Vorversuche wurden vierzehn, fünfzehn und neunzehn Tage alte Hühnerembryonenrumpfe, Kalbsleber, Kalbsthymus, Ductlostellum und grüne Kokosnüsse aus der Karibik benutzt.

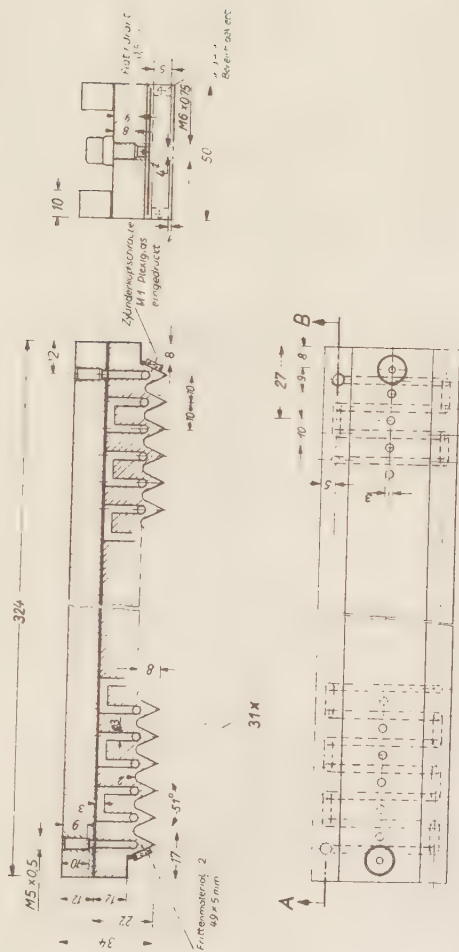
2.3. Apparate

Shandon-Acrylamid-Elektrophorese-Apparat (Shandon Southern Instruments Ltd., Camberley/England); Gelelektrophorese-Apparat, erste und zweite Dimension für Makrogele (Desaga, Heidelberg); Elektrofokussiersäule, 110 ml, 440 ml (LKB, Bromma/Schweden); Flachgelelektrophorese (Yeda, Rehovot/Israel); Watt-stabilisiertes Spannungsgerät (Instituts-eigene Werkstatt).

Mikrogelelektrophorese-Apparat und Mikrodensitometer für Spektralphotometer PMQ II (Carl Zeiss, Oberkochen/Württ.) wurde hergestellt im Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Prof. Dr. V. Neuhoff, Göttingen.

Abb.1 Modifizierte Valmet – Fokussierapparat

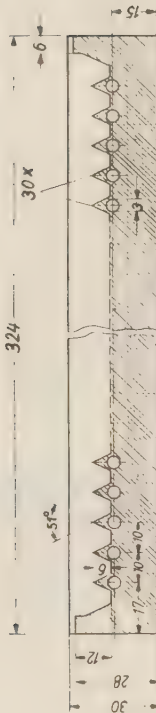
Schnitt A-B



—Son gekiebt

Oberteil m. Kühlung	Material
	PVC - klar
	Platte 12 x 25 dick

Schlauchanlage	Material
Wasser 11	LuZnPo 40



— S-lon gekiebt



Material	PVC - klar
	Platte 30u 8 dick

Unterteil im Kühlung

2 Schlaucholiven wie Oberteil

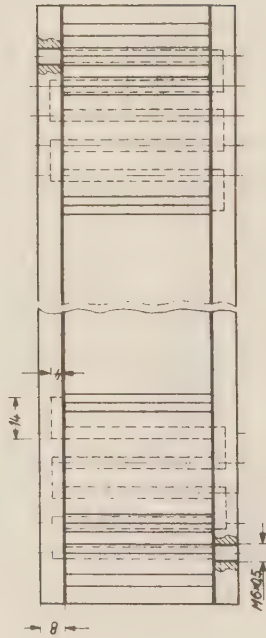
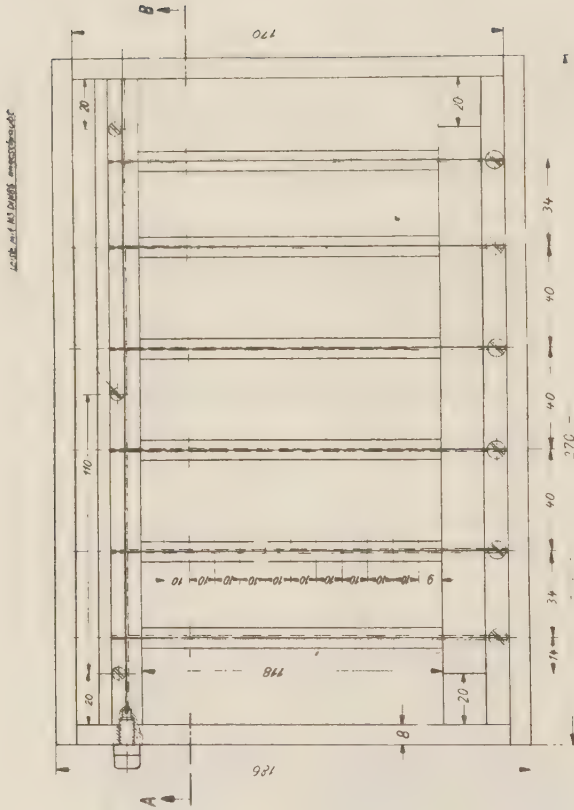
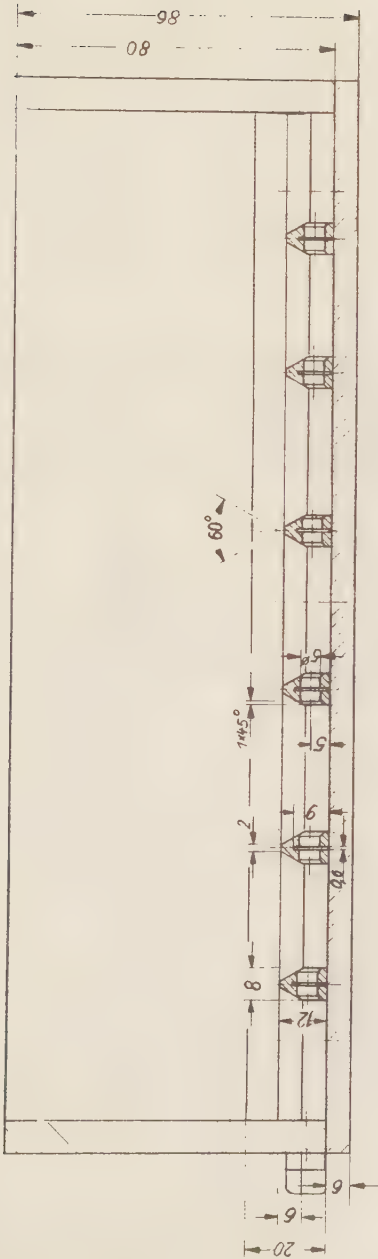


Abb. 1a



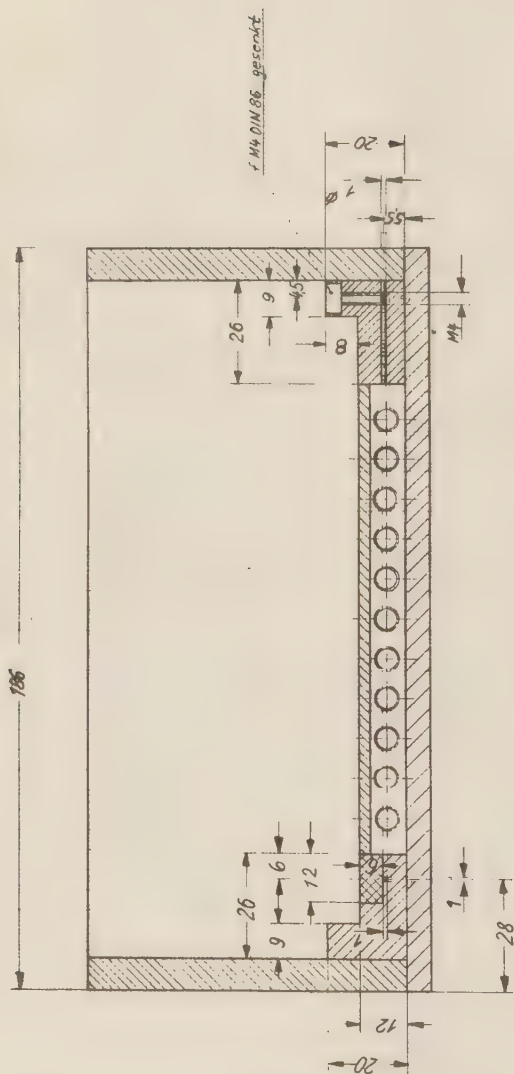
Prozesszeit Elektrolyse
220 min 35 min. Prob. n. 1

Abb. 2a



Vorderansicht Elektrophorese

Mod: 1:1



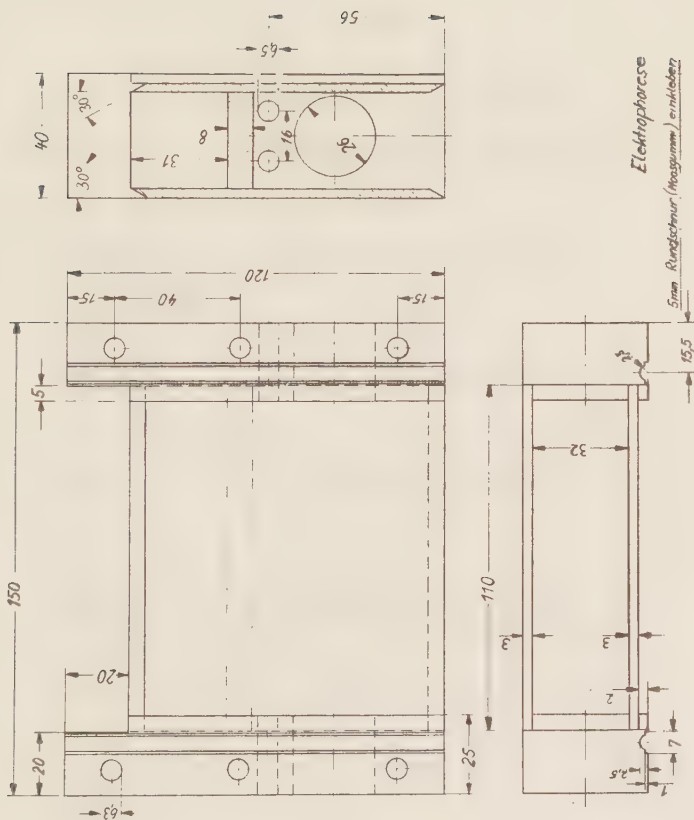
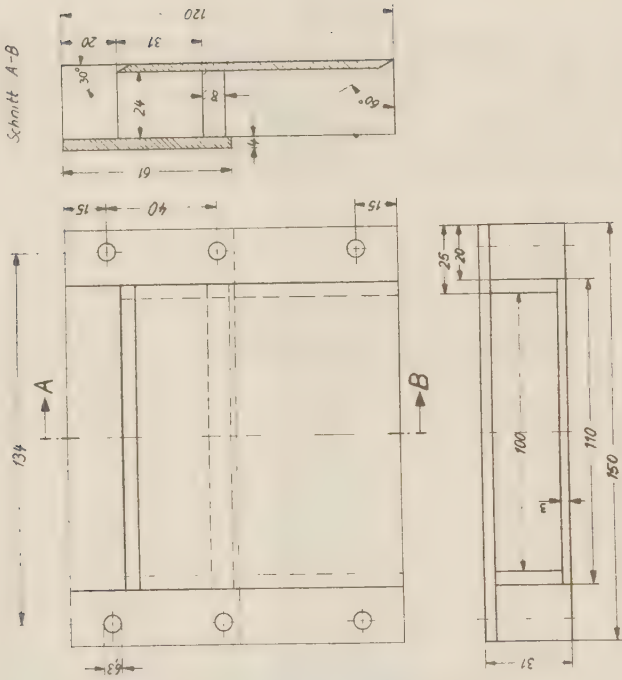


Abb. 2d



Endliche

Elektrophorese
Teil 1

Met. St. 1:1

Abb. 2e

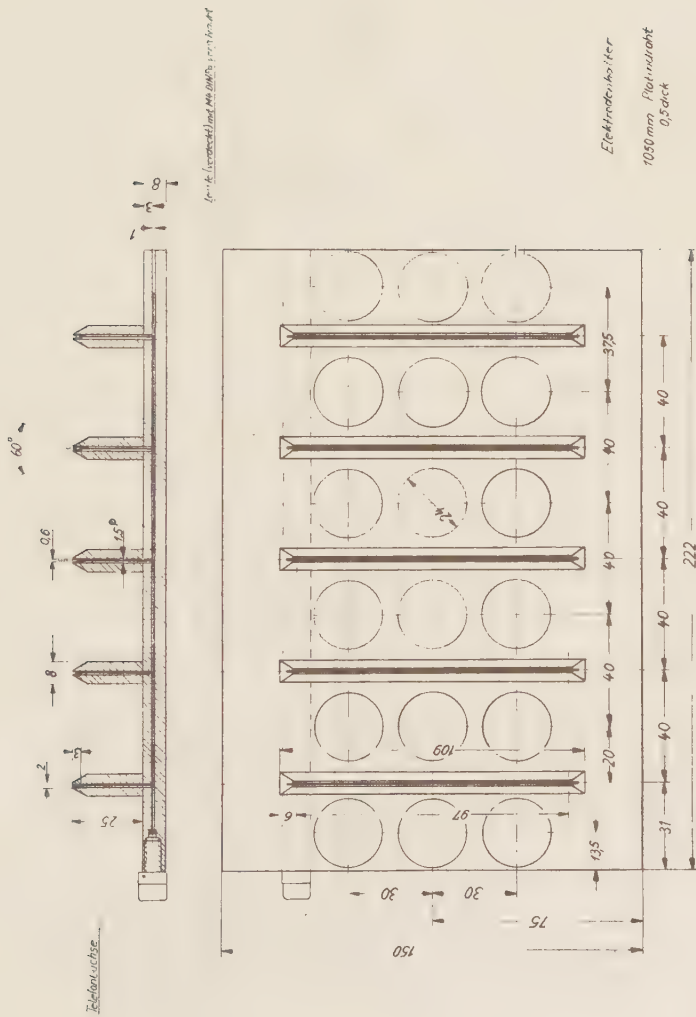
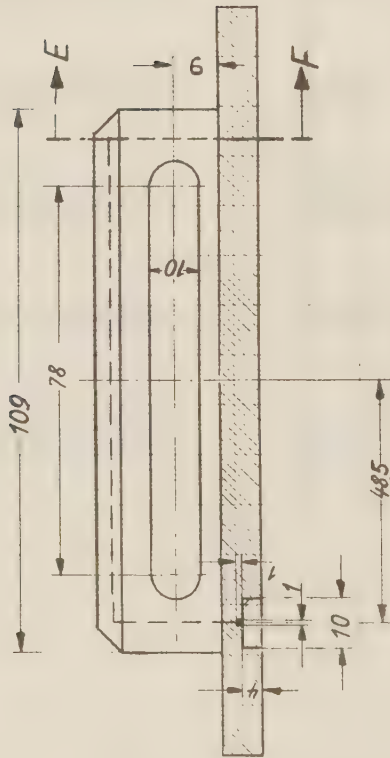
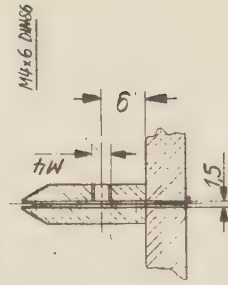


Abb. 2f

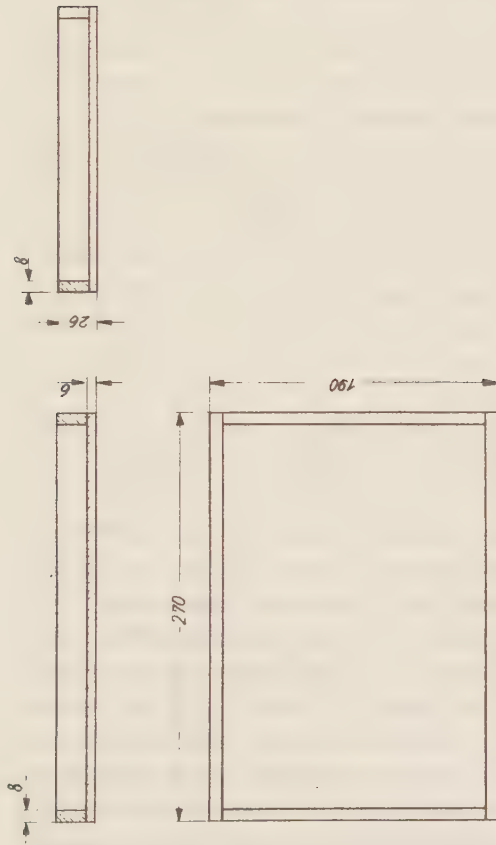
Seitenansicht Deckel



Schnitt E-F



Elektrodenhalter



Elektrophorese
(Austellachse)
Maßstab 1:2,5

In institutseigener Werkstatt von Herrn K. Rödling hergestellt: modifizierte zweidimensionale Mini-Gelelektrophorese-Apparatur nach E. Kaltschmidt und H.G. Wittmann (60), Abb. 2-2h, und die modifizierte Valmet-Fokussierapparatur (58), Abb. 1, 1a, in Zusammenarbeit mit der Fa. W. Weissig, Berlin. Herrn Dr. Töperts Valmet-Apparatur von der Schering AG, Berlin, diente als Modellvorlage für die hier beschriebene modifizierte Valmet-Apparatur.

Dounce L, 30 ml, Fa. Braun, Melsungen; Ultra Turrax (Janke und Kunkel KG, Staufen i. Breisgau).

Mikropipetten (10 μ l) (Kat.-Nr. 709109) von der Fa. Brand (Wertheim) und von der Fa. Drummond Scientific, Broomall, Pennsylvania/USA.

Spannungsgerät, Gummikappen, Pinzetten für die Mikroelektrophorese wurden von der Fa. Ernst Schütt, Göttingen, bezogen.

2.4. Zellkernisolierung nach Blobel und Potter (51)

Laktierendes Kuheutergewebe wurde unmittelbar nach Schlachtung der Kuh im eisgekühlten Puffer 1 (10 mM Tris, pH 7,8; 0,15 M NaCl) zerschnitten. Das gesamte Gewebe wurde mit 25 mM KCl, 5 mM $MgSO_4$, 50 mM Tris, pH 7,8 abgespült, im Fleischwolf zerkleinert, 1 : 2 mit Puffer 1 versetzt und im Starmixergerät (Fa. Braun) bei Stufe 1 2 min lang homogenisiert und durch 3 Lagen Verbandsmull filtriert. Das Filtrat wurde in 5 Volumina 0,25 M Saccharose, 0,025 M KCl, 0,01 M $MgCl_2$, 5 mM $NaHSO_3$, 0,05 % Triton-X-100, 0,05 M Tris, pH 7,55 aufgenommen durch 5 "Strokes" in einem locker eingepaßten Dounce, homogenisiert und bei 900 x g in einer

Kühlzentrifuge bei 0°C 20 min lang sedimentiert. Der Überstand wurde in Stickstoff eingefroren und zur Isolierung von Ribosomen, Laktalbumin- und Casein-mRNS benutzt. Das Sediment wurde 1 : 3 in 0,25 M Saccharose, 5 mM NaHSO₃, 0,01 M MgCl₂, 0,025 M KCl, 0,05 M Tris, pH 7,55 aufgenommen, in einem L-Dounce mit 5 "Strokes" homogenisiert und über 2/3 Puffer 5 (0,8 M Saccharose, 0,025 M KCl, 0,01 M MgCl₂, 5 mM NaHSO₃, 0,05 M Tris, pH 7,55) geschichtet und bei 900 x g 20 min lang abzentrifugiert. Das weiße, sämige, aber nicht viskose Sediment wurde im Phasenkontrastmikroskop auf die Reinheit der Kerne untersucht und bei -30°C eingefroren. Die Aufarbeitungszeit für 300 g Gewebe beträgt bis zu diesem Schritt ca. 24 Std. Ca. 5 ccm Kerne wurden mit Puffer 5 1 : 4 verdünnt, durch 1 "Stroke" im L-Dounce homogenisiert und über 34 ml 2 M Saccharose, 0,012 M NaCl, 0,062 M KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM NaHSO₃, 0,01 M Tris, pH 7,6 im Cellulose-Nitrat-Röhrchen (Beckman, Nr. 325609) geschichtet. Die Phasengrenze mußte mit dem Glasstab durchgerührt werden, da sonst die Kerne nicht sedimentierten. Es wurde 90 min lang bei 60.000 x g_{av.} im SW 25.2 Rotor in der Beckman-Ultrazentrifuge L 3-50 zentrifugiert. Die Reinheit der Kerne wurde elektronenmikroskopisch kontrolliert.

2.5. Chromatinpräparation

2.5.1. Informoferenwaschung

RNP-Partikel wurden aus den Kernen entsprechend der von C. Albrecht und I.M. van Zyl (52) modifizierten Methode nach O.P. Samarina et al. (53) zunächst zweimal mit 10 Volumina 1 mM MgCl₂, 0,14 M NaCl, 5 mM NaHSO₃, 10 mM Tris, pH 7 und danach durch pH-Schock viermal mit 10 Volumina

1 mM MgCl_2 , 0,14 M NaCl, 5mM NaHSO_3 , 10 mM Tris, pH 8 extrahiert.

2.5.2. Lyse der Inneren Kernmembran

Die innere Kernmembran wurde nach der Methode von S.L. Graziano und R.Ch.C. Huang (54) durch zwei saline EDTA Waschungen (0,024 M EDTA, 0,075 M NaCl, 1 mM NaHSO_3 , pH 6,5) und sukzessive Erniedrigung der Ionenkonzentration von 1 mM NaHSO_3 , 0,01 M Tris/HCl, pH 7,9 auf 1 mM NaHSO_3 , 2 mM Tris, pH 7,9 abgetrennt. Das Chromatin wurde in destilliertem Wasser (1 mM NaHSO_3), ohne daß es vorher gesichert wurde, gelöst (0,5 mg Chromatin-DNS pro ml), und bei $20.000 \times g$ 20 min lang zentrifugiert. Das nach den oben beschriebenen Methoden Isolierte Chromosomenmaterial wurde als Chromatin bezeichnet.

2.5.3. Chromatinabbau mit DNase

5 ml Hühnerembryonenmuskelchromatin mit einer DNS-Konzentration von 50 mg pro ml wurde suspendiert in 2 mM MgCl_2 , 0,25 M Saccharose, 2 mM CaCl_2 , 0,025 M NaCl, 0,125 M KCl und 20 mM Tris-Puffer, pH 7,6. Zu 0,1 ml dieser Suspension wurden 25 mg SDS hinzugefügt, ad 5 ml H_2O aufgefüllt, im L-Dounce homogenisiert und mit 4 mg DNase 30 min lang im Wasserbad bei 36°C unter Rühren inkubiert. Die Reaktion wurde im Eisbad durch Hinzufügen von EDTA ad 3 mM beendet. Die Chromatinabbauprodukte wurden über einen kontinuierlichen Saccharose-Gradienten von 15 % (Gewicht pro Volumen) auf 30 % geschichtet und im SW 25.2 Rotor 45 min lang bei 23.000 rpm in der Beckman-Ultrazentrifuge sedimentiert. Überstand und Sediment wurden auf die Histonzusammen-

setzung analysiert.

2.6. Dissoziation des Chromatins

2.6.1. 0,35 M Guanidiniumhydrochlorid-Dissoziation

Das Chromatin wurde mit festen Substanzen auf 6 M Harnstoff, 0,35 M Guanidiniumhydrochlorid, 2 mM Dithioerythrit, 1,5 mM NaHSO_3 , 2 mM EDTA, 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7 gebracht, so daß 1 ml Dissoziationspuffer ca. 1 mg DNS enthielt (55). Es wurde 48 Std. lang im Ti-60-Rotor bei 50.000 rpm ($176.000 \times g_{av.}$) und 3°C in der Beckman-Ultrazentrifuge L3-50 sedimentiert. Die im Überstand befindlichen Kernproteine wurden als Ausgangsmaterial für die Bio-Rex 70 Ionenaustauscherchromatographie verwendet. Diese Proteine erhielten den Index 0,35 M Gua.

2.6.2. 3 M NaCl-Dissoziation

Die partiell dissoziierten Nukleoproteinsedimente wurden mit festen Substanzen auf 3 M NaCl, 6 M Harnstoff, 2 mM Dithioerythrit, 2 mM EDTA, 1,5 mM NaHSO_3 , 1 mM Tris, pH 8,3 gebracht (1 mg DNS pro ml Dissoziationspuffer) und im Ultra Turrax 3 min lang bei 60 Volt in einem 250 ml Meßzylinder (Durchmesser 5 cm, 250 ml Dissoziationspuffer) geschert und danach im Ti-60-Rotor 60 Std. lang bei 60.000 rpm ($254.000 \times g_{av.}$), 4°C zentrifugiert. Die im Überstand befindlichen Proteine erhielten den Index 3 M NaCl.

2.7. Histonabtrennung durch Bio-Rex 70 Ionenaustauscher-Chromatographie

Bio-Rex 70 Ionenaustauscher (IRC-50) wurde entsprechend den Bedingungen von W. Hirs (56) und von J. Bonner et al. (57) vorbehandelt, gereinigt und mit dem Chromatindissoziationspuffer (0,35 M Guanidiniumhydrochlorid, 6 M Harnstoff, 2 mM Dithioerythrit, 1,5 mM NaHSO_3 , 2 mM EDTA, 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7) äquilibriert. Sowohl die Kernproteinfraktion der 0,35 M Gua.-Dissoziation als auch die gescheuerte Kernproteinfraktion der 3 M NaCl-Dissoziation, die vorher umdialysiert wurde auf die Äquilibrierungspufferbedingungen des Bio-Rex 70 Ionenaustauschers, wurden entsprechend den Bedingungen von Levy et al. (55) jeweils auf die Bio-Rex 70 Säule aufgetragen. Dabei wurde für 100 mg chromosomale Proteine ein Säulenbettvolumen von 2,5 cm x 10 cm benutzt. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 30 ml pro Stunde. Die Säule wurde mit 3 Teilen Leervolumen Äquilibrierungspuffer gewaschen, und von den beiden Kernfraktionen wurden dann die Histone und die stark basischen NHC-Proteine (Bio-Rex 70 Elution) mit 4 M Guanidiniumhydrochlorid, 6 M Harnstoff, 1 mM NaHSO_3 und 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7 von der Säule eluiert, ad 50 mM Mercaptoäthanol hinzugefügt, 3 Std. lang bei 37°C reduziert und mit 4 M Ammoniumsulfat (auf pH 7 gebracht) im Dialyseschlauch gefällt (Dialysierzelt ca. 35 Std.). Zunächst wurden dann bei dreimaligem Wechsel gegen die 100fache Menge 0,1 N Essig, 1 mM Mercaptoäthanol dialysiert und dann die Alkohol-Äther-Fällung bei dreimaligem Wechsel gegen die 10fache Menge (Äthanol zu Äther zu Wasser wie 3:1:1; 5 mM Mercaptoäthanol) bei 3°C im Dialyseschlauch durchgeführt. Die ausgefällten Proteine wurden gefriergetrocknet.

2.8. Aufbereitung der von Bio-Rex 70 nicht adsorbierten NHC-Proteine

Die von Bio-Rex 70 nicht adsorbierten NHC-Proteinfraktionen wurden im Visking-Dialysierschlauch 35 Std. lang gegen 4 M Ammoniumsulfat (auf pH 7 gebracht) und 2 mM Mercapto-äthanol bei 4°C dialysiert und gefällt. Das Verhältnis von Dialyselösung zu Dialysat war 50 : 1. Die Dialyselösung mußte mit Ammoniumsulfat nachgesättigt werden. Die gefällten NHC-Proteine wurden in der Sorvall-Zentrifuge im SS-34 Rotor bei 20.000 rpm 20 min lang sedimentiert und gegen 7 M Harnstoff, 50 mM Dithioerythrit bei 3maligem Wechsel 10 Std. lang dialysiert. Die gelösten NHC-Proteine wurden dann 3 Std. lang (3maliger Wechsel) umdialysiert gegen 2 mM Dithioerythrit, 7 M Harnstoff.

2.9. Präparative Isoelektrische Fokussierung mit dem Zonen-Konvektions-Elektrofokussierapparat nach Valmet (58); Abb. 1

Die Trogböden der Valmet-Apparatur wurden mit Dialyserschlauch ausgelegt. 45 ml NHC-Proteinlösung (ca. 60 - 80 mg Protein in 7 M Harnstoff, 2 mM Dithioerythrit, 3 % Ampholine, pH 3 - 10) wurden in 1,6 ml Portionen auf 28 Tröge verteilt. Der Anodentrog wurde mit 1,6 ml Anodenflüssigkeit (10 % Saccharose, hochverdünnte Phosphorsäure, pH 2,95, 7 M Harnstoff) gefüllt; der Kathodentrog mit 1,6 ml Kathodenflüssigkeit (10 % Saccharose, 7 M Harnstoff und hochverdünnte Äthylendiaminlösung, pH 10,2).

Die Fokussierung wurde bei 4°C mit einer Anfangsleistung von 650 Volt, 2 mA, mit einem leistungsstabilisierten Hochspannungsgerät betrieben. Nach 60 Std. war die Fokussierung

beendet. Die Spannung betrug dann ca. 1,250 Volt. Nach Messung des pH-Gradienten wurden die fokussierten NHC-Proteine aus jeweils 3 hintereinanderliegenden Trögen gesammelt, so daß 7 NHC-Proteinfraktionen von der 0,35 M Gua.-Chromatindissoziation und 7 NHC-Proteinfraktionen von der 3 M NaCl-Dissoziation erhalten wurden. Alle Fraktionen wurden 50 Std. lang (8maliger Wechsel) gegen 5 mM Mercapto-äthanollösung dialysiert und danach gefriergetrocknet.

2.9.2. Präparative isoelektrische Fokussierung in der LKB-Säule

Die präparative isoelektrische Fokussierung wurde in 6 M Harnstofflösung in einem Saccharose-stabilisierten (0 - 50 % Gewicht pro Volumen) pH-Gradienten (1 % Ampholine, pH 3 - 10) in einer 440 ml Elektrofokussiersäule von LKB (oder 110 ml) mit und ohne 0,5 % von dem nichtionischen Detergens Brj 35 entsprechend der Methode von A.D. Friesen (90) bei 15°C durchgeführt. Die Anfangsspannung betrug 320 Volt, 15 mA und stieg nach Beendigung der Fokussierung nach ca. 60 Std. auf 800 Volt (6 mA).

Weiterhin wurde die Fokussierung modifiziert durch ein Lösungsmittelgemisch aus DMSO 20 % (V/V) und wäßriger Harnstofflösung (6M) in einem Glycerin-Gradienten (von 0 - 60 %). Die Elution erfolgte mit einem Schlauch aus der Fokussierkammer.

2.10. Gelelektrophoresen

2.10.1. Mikrogelelektrophorese nach V. Neuhoff (94)

2.10.1.1. Reinigung von Mikrokapillaren

10 und 5 μ l Kapillaren wurden in Chromschwefelsäure oder Nitratschwefelsäure bzw. Acrylamid verunreinigte Mikrokapillaren in Natriumhypochlorid in einer Saugflasche mit einer Vakuum-Luftdruckfrequenz von 5 min 2 Std. lang gereinigt. Danach wurden die Mikrokapillaren in einer Fritte zunächst mit Wasser bis zum Neutralpunkt, dann mit Alkohol und Aceton (p.A.!) gespült. Die Mikrokapillaren wurden bei 80°C getrocknet.

2.10.1.2. Herstellen von Mikrogelgradienten für ein SDS-Puffersystem (91,93)

Der kontinuierliche Konzentrationsgradient konstituierte sich nach Durchmischung der Peroxodisulfat enthaltenden Phase (Lösung C) und der zweiten, alle übrigen Komponenten enthaltenden Phase. Für basische Puffersysteme wurde eine 0,025%ige Ammoniumperoxodisulfatlösung (Lösung C) 18mm hoch in eine 32 mm lange 10 μ l Kapillare gesaugt. Bei Verwendung von Harnstoffgelen enthielt die Peroxodisulfatlösung noch 6 M Harnstoff. Die restlichen 14 mm wurden im Falle der Herstellung eines 2,8M Tris/Sulfat-Gelpuffersystems, pH 8,8 mit den Lösungen A/B, Mischungsverhältnis 1 : 3 kapillar hochgesogen.

Lösung A:

3,39 g Tris
+ 6,0 ml 1 N H_2SO_4
+ 0,1 ml TEMED
+ H_2O ad 10 ml

pH 8,8

Lösung B:

für Gradienten von 1 - 40 %
2 % Vernetzung

19,6 g Acrylamid
+ 400 mg Bisacrylamid (um-
kristallisiert)
+ H₂O ad 37,5 ml

für 50 %iges Gel

6,67 g Acrylamid
+ 0,133 g Bisacrylamid
+ H₂O ad 10 ml

Die gefüllten Kapillaren wurden sofort in eine Kristall-
silierschale (Durchmesser: 3 cm) gestellt, die 1,5 ml 60 %ige
Saccharose und 50 µl 1 : 40 verdünnte Ammoniumperoxodisul-
fatlösung (ausgehend von 0,025% oder 0,2%) ent-
hielt.

Der Elektrodenpuffer setzte sich zusammen aus 0,05 M Tris/
Glycin pH 8,4 und 0,1 % SDS. Dem kathodischen Elektroden-
puffer wurde als Reduktionsmittel 0,1 % (V/V) Thioglycol-
säure zugefügt. Die Gele wurden bis zu 6 Monaten in 1 : 8
verdünnter Lösung A bei 4°C aufbewahrt.

2.10.1.3. SDS-Inkubation und Gelelektrophorese der chromo-
somen Proteine; Densitometrieren der Gele

Für die SDS-Gelelektrophorese wurden jeweils 1 mg NHC-Pro-
teine 2 min lang bei 100°C inkubiert in 1 ml Puffer folgen-
der Zusammensetzung (Probenpuffer):

0,035 M Tris/Sulfat pH 8,6
1 % Dithioerythrit
1 % SDS
10 % Glycerin

Farbstofflösung:

11 mM Bromphenolblau

10 % Saccharose in Proben-
puffer

2 µg Dodecylsulfat-beladenes Protein wurde entsprechend der Methode von R. Rüsche et al. (91) in 10 µl Kapillaren über einen kontinuierlichen Acrylamidgradienten von 1 - 40 % bzw. 1 - 50 % in einem diskontinuierlichen Puffersystem (Elektrodenpuffer 0,05 M Tris/Glycin pH 8,4 - 0,1 % SDS; Gelpuffer: 2,8 M Tris/Sulfat pH 8,8) elektrophoretisch getrennt. Die Elektrophorese wurde in den ersten fünf Minuten bei konstanter Spannung von 40 Volt, dann bei 80 Volt bis zum Austritt der Farbstofffront und danach noch 30 min bei 100 Volt ausgeführt.

Als Markerproteine für die Molekulargewichtsbestimmung dienten Phosphorylase (MG 92.500), Aldolase (MG 39.500) und Cytochrom c (MG 12.500). Die Gele wurden zehn Minuten lang bei 50°C in folgender Lösung angefärbt:

0,187 % Coomassie Brilliant Blue, R 250 (Gewicht pro Volumen),
93 % wäßrige Methanolösung (Methanol zu Wasser wie 1 : 1),
7 % Eisessig.

Entfärbt wurden die Gele in 7 % Eisessig und sofort danach bei 570 nm im Zeiss - Spektralphotometer (Spaltbreite von 0,02 bis 0,015; Vorschubgeschwindigkeit 0,5 mm bis 2 mm pro Minute) mit einem Microdensitometer die optische Dichte aufgezeichnet (Schreibergeschwindigkeit 30 mm pro Minute; 10 mV). Die Gele wurden bei -30°C eingefroren. Fotografiert wurden die Gele (24 x 36) mit einem Agfa ortho 25 Film und 1 : 20 vergrößert.

2.10.1.4. Mikrogradienten-Gelelektrophorese-System ohne
ionisches Detergens

2.10.1.4.1. Basische Puffersysteme nach D.I. Wolfrum et al. (93)

Gelpuffer: 350 mM Tris/Sulfat, pH 8,4
Elektrodenpuffer: 50 mM Tris/Glycin, pH 8,4, 6 mM Harnstoff
Lösung A: 1,4 M Tris/Sulfat, pH 8,4, 1 % (V/V)
TEMED, 6 M Harnstoff
Lösung B: Für Gradienten von 1 - 40 % Acrylamid, 10 %
Vernetzung: 18 g Acrylamid, 2 g Bisacryl-
amid, 13,5 g Harnstoff + H₂O ad 37,5 ml
Probenpuffer: 6 M Harnstoff, 0,14 M Tris/Sulfat pH 8,4
Lösung C: 6 M Harnstoff, 0,07 %ige Ammoniumperoxo-
disulfatlösung

Gelpuffer: 350 mM Tris/Sulfat, pH 9
Elektrodenpuffer: 65 mM Tris/Borsäure, pH 9
Lösung A: 1,4 M Tris/Sulfat, pH 9, 1 % (V/V) TEMED,
6 M Harnstoff
Lösung B: wie unter 2.10.1.4.1. (siehe oben)
Probenpuffer: 0,14 M Tris/Sulfat, pH 9, 6 M Harnstoff
Lösung C: wie unter 2.10.1.4.1. (siehe oben)

2.10.1.4.2. Saures Puffersystem nach D.I. Wolfrum et al. (93)

Gelpuffer: 250 mM Na⁺/Essigsäure, pH 4,5
Elektrodenpuffer: 6 M Harnstoff, 50 mM β -Alanin/Essigsäure,
pH 4,5
Lösung A: 6 M Harnstoff, 1 M NaOH/Essigsäure, pH 4,5
Lösung B: wie unter 2.10.1.4.1.
Probenpuffer: 6 M Harnstoff, 0,1 M NaOH/Essigsäure, pH 4,5
Farbstofflösung: 0,01 % Pyronin A in Probenpuffer

Lösung C: 6 M Harnstoff, 0,2 %ige Ammoniumperoxodisulfatlösung

2.10.1.4.3. Modifiziertes Elektrophoresepuffersystem nach R. Lim und E. Tadayyon (92)

Gelpuffer: 0,58 M Essigsäure/KOH, pH 3,4

Elektrodenpuffer: Kathode (oben): 110 mM Glycin/16 mM Thio-
glycolsäure, pH 4, 5 M Harnstoff
Anode (unten): 4,6 M Eisessig, 60 mM KOH,
pH 2,7

Lösung A: 1 % TEMED (V/V), 1M KOH, 2,32 M Eisessig,
5 M Harnstoff, 25 % (V/V) Glycerin, 0,25 %
(V/V) Tween 20

Lösung B: 18 g Acrylamid
2 g Bisacrylamid
0,093 ml Tween 20
11,25 g Harnstoff + H₂O ad 37,5 ml

Lösung C: 0,2 % (Gewicht pro Volumen) Ammoniumper-
oxodisulfat, 5 M Harnstoff, 25 % Glycerin,
0,25 % Tween 20

Probenpuffer: 50 mM Na₂CO₃
8 M Harnstoff
5 % (V/V) Tween 20
25 % (V/V) Glycerin
2 mM Thioglycolat, Na-Salz
10 % (Gewicht pro Volumen) Dithioerythrit

Farbstofflösung: 0,01 % Pyronin A in Probenpuffer

2.10.1.5. Isoelektrische Fokussierung im Mikrogel nach
V. Neuhoff (95)

Die Fokussierung wurde in 5,1 cm langen 10 µl Kapillaren von Drummond durchgeführt; das Acrylamidgel hatte folgende Zusammensetzung:

6,4	%	Acrylamid (Gewicht/Volumen)
0,14	%	(Gewicht/Volumen) Bisacrylamid
3,8	%	(V/V) Ampholine
12	%	(Gewicht/Volumen) Saccharose
25	%	(V/V) Glycerin
5,33	M	Harnstoff
0,12	%	(V/V) Tween 20
0,12	%	(V/V) Triton-X-100
0,12	%	(V/V) Lubrol PXR

Elektrodenschutzlösung:	12 %	Saccharose, 5 %	Ampholine
Anodenflüssigkeit:	12 %	Saccharose mit H_2SO_4 , pH 2,9	
Kathodenflüssigkeit:	12 %	Saccharose mit Äthylendiamin, pH 10,5	
Probenlösung:	2	mg Protein/ml:	
	8	M	Harnstoff
	40	%	Glycerin (V/V)
	5	%	Dithioerythrit
	5	%	Tween 20 (V/V)
	0,25	%	(V/V) Lubrol PXR
	0,5	%	(V/V) Triton-X-100
	0,01	%	(Gewicht/Volumen) Digitonin
	5	%	(V/V) Ampholine

Nach einer Stunde bei 100 V konstanter Spannung war die Fokussierung beendet.

Die Ampholine-Gele wurden in einer 0,1 ‰ Lichtgrünlösung (Methanol : 0,5 N Essigsäure wie 1 : 3) gefärbt und entfärbt in 0,5 N Essigsäure/Methanol (4 : 1).

2.10.1.6. Mikrogelelektrophorese im homogenen 6,4 %igen
Acrylamid-Gel

10 μ l Kapillaren wurden mit 7 μ l Trenngelpuffer und 0,5 μ l Probengelpuffer gefüllt. 1 μ g Protein in 1 μ l Probenpuffer wurde bei 100 μ A, 60 V, bis zum Austritt der Farbstofflösung elektrophoretisch getrennt.

Elektrodenpuffer: 0,014 M Glycin
0,015 M NaOH
0,006 M NaCl
6 M Harnstoff

Im kathodischen Elektrodenpuffer befand sich 0,1 % Thio-
glycolsäure.

Trenngelpuffer: 6,4 % Acrylamid
0,25 % Bisacrylamid
0,5 M Glycin/NaOH, pH 11,2
0,01 M NaCl
0,3 % TEMED
1 % Tween 20
1 % Lubrol P_R
1 % Triton-X-100
1 ‰ Digitonin
6 M Harnstoff

Probenpuffer: 6 M Harnstoff
250 mM Glycin/NaOH, pH 11,3
5 % Dithioerythrit
5 % Tween 20
0,25 % Lubrol P_R
0,5 % Triton-X-100
0,1 ‰ Digitonin

Probengel: 1 mg Protein/ml Probenlösung:
0,5 M Glycin/NaOH, pH 11,2
1 μ l Biogel A 50
6 M Harnstoff

Farbstofflösung: 6 M Harnstoff
40 % Glycin
0,01 % Bromphenolblau

2.10.1.7. Mikrogelelektrophorese im Flachgel

Ein 6,4 %iges Acrylamidgel (0,14 % Bisacrylamid) wurde zwischen zwei Spiegelglasscheiben (3 x 25 x 40 mm; 0,3 mm dicke Edelstahlabstandhalter) polymerisiert und die eine Glasscheibe vom Gel abgenommen. Das Gel wurde 3 Stunden lang dialysiert gegen den Gelpuffer (Phenol : Essigsäure : Wasser wie 2 : 1 : 1; Gewicht/Volumen/Volumen) (96) bzw. gegen den Gelpuffer (Phenol : Ameisensäure : Wasser wie 2 : 1 : 1; Gewicht/Volumen/Volumen) (97). In einer verschließbaren Kammer wurden zwei Platinelektroden auf zwei waagerechten Kunststoffstäben befestigt. Als Kontakt zwischen Elektrode und Gel diente ein 3 mm starkes Fließpapier, das mit dem entsprechenden Elektrodenpuffer (Elektrodenpuffer = Gelpuffer) getränkt wurde. Die Proben wurden gelöst in dem entsprechenden Gelpuffer (1 mg/ml), der außerdem 0,5 % (Gewicht/Volumen) Dithioerythrit enthielt und aufgetragen in ein mit einer Rasterklinge eingeritztes Probenloch. 1 µg Protein wurde 30 Minuten lang bei 100 V elektrophoretisch getrennt.

2.10.2. Makrogelelektrophoresen

2.10.2.1. Elektrophoresepuffersystem für Histone

Histone wurden elektrophoretisch aufgetrennt entsprechend den Bedingungen von S. Panyim und R. Chalkley (98), J. Bonner et al. (99) und den Ionenaustauscher-Elektrophorese-Bedingungen von J.R. Jolice und H.G. Klemperer (100).

2.10.2.2. Fluoreszenzmarkierung von chromosomalen Proteinen

Die Fluram-markierten chromosomalen Proteine wurden unter den gleichen Bedingungen elektrophoretisch getrennt wie von J.L. Pace et al. (101) beschrieben wurde.

2.10.2.3. SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli (59) im Makrogel

Sowohl die SDS-Inkubation als auch die SDS-Gelelektrophorese von NHC-Proteinen und Histonen wurden entsprechend den Bedingungen von U.K. Laemmli (59) in dem eindimensionalen Gelelektrophorese-Apparat von Kaltschmidt und Wittmann (60) ausgeführt. Die Trenngellänge betrug 19 cm, die Sammelgellänge 1,5 cm, der Durchmesser der Perspexröhrchen 4 mm. Die aufgetragene Proteinmenge betrug ca. 200 µg. Die Elektrophorese wurde bei 1 mA (konstante Spannung) pro Röhrchen so lange durchgeführt, bis die Bromphenolblaubande das Trenngel erreichte, und danach bei 3 mA pro Röhrchen weiterlaufengelassen, bis die Bromphenolblaubande das Gel-Ende erreichte (ca. 12 Std.).

2.10.2.3.1. Anfärben der Makrogele

Die Gele wurden 30 Minuten lang im Coomassie Brilliant Blue Färbegrad nach O. Vesterberg (62) (Coomassie Brilliant Blue Färbegrad: 75 ml Methanol, 186 ml H₂O, 30 g Trichloressigsäure, 9 g Sulfosalicylsäure, 280 mg Coomassie Brilliant Blue R-250) erwärmt, und 3 Tage lang in Äthanol : Wasser : Eisessig wie 100 : 260 : 32, V/V/V, entfärbt.

2.10.2.3.2. Molekulargewichtsbestimmung der NHC-Proteine im Makrogel

Die Molekulargewichte der einzelnen angefärbten Banden wurden näherungsweise bestimmt aufgrund des logarithmischen Zusammenhangs zwischen Molekulargewicht und Mobilität (61), wobei folgende Proteine als Standard benutzt wurden:

γ -Globulin aus Humanserum, MG: 160.000;
 β -Galaktosidase, MG: 130.000;
Albumin aus Hühnerei, MG: 45.000;
Chymotrypsinogen A, MG: 25.000;
Myoglobin vom Pferd, MG: 17.800;
Cytochrom c, MG: 12.400.

2.10.2.4. 2 D nach A.R. Subramanian (102)

Die basischen chromosomalen Proteine wurden in einer modifizierten zweidimensionalen Gelelektrophoreseapparatur (s. Abb. 2) nach Kaltschmidt und Wittmann (Dimension des Gels: 10 x 10 x 0,2 cm) in einem Puffersystem und zu gleichen Bedingungen wie bei A.R. Subramanian (102) beschrieben,

aufgetrennt. Als Markerproteine für die Molekulargewichtsbestimmung wurden Cytochrom c (MG: 12.400) und Myoglobin (MG: 17.800) benutzt.

2.10.2.5. 2 D in der Yeda-Apparatur

Sowohl von den gesamten gefriergetrockneten, nicht fokussierten NHC-Proteinen, als auch von den Histonfraktionen wurden 2-D-Elektrophoresen durchgeführt. Die erste Dimension für Histon- und NHC-Proteinfraktionen wurde in dem Flachgelelektrophorese-Apparat von Yeda mit einem Gelpuffer (1,8 N Eisessig, 6 M Harnstoff, 0,3 % TEMED, 7,5 % Acrylamid, 0,3 % Bisacrylamid, pH 3,7) und einem sterilierten Elektrodenpuffer (0,4 N Eisessig, 0,03 N Asparaginsäure) ausgeführt.

Nach vierstündiger Vorelektrophorese bei 200 Volt wurden ca. 400 µg Protein in 30 µl 7 M Harnstoff, 7 mM Dithioerythrit in einem Geltrog (Trogformer M_2) appliziert und ca. 7 Stunden bei 200 Volt elektropherografiert, bis die Methyleneblaubande (0,001 % wäßrige Methyleneblaulösung) die Kathode erreicht hat.

Die zweite Dimension (18 % Acrylamid) wurde ebenfalls ausgeführt in dem Elektrophorese-Apparat von Yeda mit einem Gelpuffer (Eisessig/KOH, pH 4,6) und einem Elektrodenpuffer (Glycin/Eisessig) nach E. Kaltschmidt und H.G. Wittmann (60). Die Laufzeit betrug 12 Stunden bei 250 V.

Die 0,35 M Gua.-Histonfraktion wurde in der ersten Dimension in dem Yeda-Elektrophorese-Apparat mit einem Puffersystem (β-Alanin/Eisessig; Eisessig/KOH, pH 4,75) nach P. Spitnik-Elson (63) getrennt. Nach einstündiger Polymeri-

sation bei Zimmertemperatur wurde bei 40 Volt 16 Stunden lang mit dem sterilisierten Elektrodenpuffer (0,07 M B-Alanin/Eisessig, pH 4,5) die Vorelektrophorese durchgeführt. 200 µg Protein in 20 µl 7 M Harnstoff und 7 mM Dithioerythrit wurden dann in eine M_3 -Trogform appliziert und 5 Stunden lang bei 260 Volt im Kühlraum bei 4°C elektrophoretografiert. Die zweite Dimension wurde nach dem Elektrophorese-System wie oben beschrieben (60) durchgeführt.

Die Gele wurden fotografiert mit einem HC 135-36 Film der Firma Kodak unter Verwendung eines Grünfilters (Blende 16 bei 55 cm Abstand, 5 Sekunden).

2.10.2.6. 2 D in der DESAGA-Apparatur

Sowohl die gesamten NHC-Proteine als auch die in der LKB-Fokussiersäule vorfraktionierten NHC-Proteine wurden in der ersten Dimension isoelektrisch fokussiert (entweder pH 3 - 10 oder Teilbereiche, zum Beispiel pH 5 - 7) und in der zweiten Dimension im SDS-Phosphatpuffersystem nach dem Molekulargewicht elektrophoretisch aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde unter gleichen Bedingungen ausgeführt wie bei A.J. Mac Gillivray und D. Rickwood beschrieben (50).

2.10.3. Aminosäureanalyse

1 mg Proteingemisch der einzelnen chromosomalen Proteinfractionen wurden in 1 ml quarzdestillierter 6 N HCl 24 Stunden lang unter N_2 bei 110°C hydrolysiert (siehe Aufarbeitungsschema S. 41). Nach Verdampfung der HCl (mit

H₂O zweimal nachspülen) Im Exsiccator (Trockenmittel: KOH) wurde die Aminosäureanalyse im Durrum-Aminosäureanalysator durchgeführt.

2.10.4. Protein-DNS-RNS-Bestimmungen

RNS-Bestimmung nach M. Ogur et al. (64)

0,2 ml Aliquots der Chromatinlösung wurde mit 0,1 ml 0,9 M NaOH bei 37°C 60 min lang inkubiert und 1,7 ml 0,3 M Perchlorsäure hinzugefügt, 15 min lang zentrifugiert und die O.D. des Überstandes bei 260 nm gemessen; 32 µg pro ml der hydrolysierten RNS in dieser Lösung ergeben eine O.D.₂₆₀ von 1,0 (d = 1 cm).

RNS-Routinekonzentrationsbestimmungen wurden spektrophotometrisch bei 260 nm durchgeführt. Das Probenmaterial wurde zu diesem Zweck in kalter, 5 %iger Perchlorsäure gelöst und anschließend alkalisch hydrolysiert (0,2 N KOH, 20 min, 100°C). Eine O.D.₂₆₀ entspricht 32 µg RNS pro ml H₂O. Die Differenz zwischen Gesamtnukleinsäure und RNS ergab die DNS-Konzentration.

Protein- und DNS-Bestimmung

Protein wurde bestimmt nach Lowry et al. (65) und DNS nach K. Burton (66). Routinemäßige Gesamtnukleinsäurebestimmungen wurden spektrophotometrisch bei 260 nm durchgeführt, indem die Probe mit 5 %iger Perchlorsäure 20 min lang auf 100°C erhitzt wurde; 1 mg DNS pro ml H₂O ergibt eine O.D.₂₆₀ von 30.

2.10.5. Elektronenmikroskopie

Die Proben für die Elektronenmikroskopie wurden in Anlehnung an M.J. Karnovsky (67) aufbereitet. Nach einstündiger Fixierung in 10 Volumen 0,06 M Natriumcacodylat pH 7,3, 3 % Glutaraldehyd, 3 % Formaldehyd, 0,05 % $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ und dreimaligem Auswaschen zur Entfernung überschüssigen Aldehyds in 0,1 M Na-Cacodylat, pH 7,3 wurde je 0,2 g Material mit OsO_4 (1 ml 1 % OsO_4 , 0,1 M Na-Cacodylat, pH 7,3) für eine Stunde bei 0°C kontrastiert. Nach zweimaligem Auswaschen in 0,1 M Na-Cacodylat wurde abzentrifugiert, das Sediment mit einigen Tropfen einer erwärmten 2 %igen wäßrigen Agarlösung versetzt, abgekühlt und in ca. 1 mm^3 große Würfel geschnitten. Entwässert wurde in einer Acetonreihe steigender Konzentration (30 %, 50 %, 75 %, 90 % und 100 %).

Das Material wurde eingebettet in Polyester (Mikropal, Ferak AG, Berlin) und im Ultramikrotom geschnitten. Die Schnitte wurden nach E.S. Reynolds (68) nochmals mit Bleicitrat und Uranylacetat nachkontrastiert und im Siemens-Elektronenmikroskop fotografiert.

```

graph TD
    A[Zellkernreinigungsschritte 2. 4.] --> B[Informierenwaschung 2. 5. 1.]
    B --> C[Lyse der inneren Kernmembran 2. 5. 2.]
    B --> D[Chromatin]
    D --> E[Differentielle Chromatindissoziation  
mit 0, 35 M Guanidiniumhydrochlorid 2. 6. 1.]
    E --> F[Überstand: chromosomale Proteine 0, 35 M Gua.]
    F --> G[Bio-Rex 70 Ionenaustauscherchromatographie 2. 7.]
    G --> H[0, 35 M Gua. Histonfraktion]
    H --> I[0, 35 M Gua. NHC-Fraktion]
    I --> J[Fraktionierung nach dem IP in der  
0, 35 M Gua. NHC-Proteine  
Fr. 1. 2. 3. 4. 5. 6. 7.]
    J --> K[2-D-Gelelektrophorese  
2. 10. 2. 1.]
    J --> L[Fraktionierung nach dem Molekulargewicht im Mikrogradientengel 2. 10. 1. 3.  
Fr. 1. 2. 3. 4. 5. 6. 7.]
    L --> M[Aminosäureanalyse 2. 10. 3.]
    F --> N[Überstand: chromosomale Proteine 3 M NaCl]
    N --> O[Bio-Rex 70 Ionenaustauscherchromatographie 2. 7.]
    O --> P[3 M NaCl NHC-Fraktion]
    P --> Q[3 M NaCl Histonfraktion]
    Q --> R[2-D-Gelelektrophorese  
2. 10. 2. 1.]
  
```

3. Ergebnisse

3.1. Zellkernisolierung

Um proteolytische Prozesse bei der Aufarbeitungsprozedur zu inhibieren, wurde zu allen Puffern der Zellkernisolierung, der Chromatinpräparation und der Chromatindissoziation der Proteasehemmer Natriumhydrogensulfit hinzugefügt (69, 70).

Die zu analysierenden NHC-Proteine sollten so wenig wie möglich verunreinigt sein durch cytoplasmatische Proteine und Membranproteine. Dies wurde erreicht, indem die äußere Zellkernmembran mit dem anhaftenden endoplasmatischen Retikulum selektiv abgetrennt wurde durch Triton-X-100 Behandlung und anschließende Zentrifugation über hochmolare Saccharose (51).

Wie aus Abbildung 3 c zu entnehmen ist, besitzen die Zellkerne nach der hochmolaren Saccharose-Zentrifugation keine äußere Membran mehr, während nach Zentrifugation über niedermolare Saccharose noch cytoplasmatische Bestandteile und die äußere Zellkernmembran vorhanden sind. (Abb. 3 a und 3 b).

3.2. Chromatinisolierung

Der Porenkomplex der inneren Zellkernmembran wird durch 1 - 10 mM Mg^{++} -Ionen stabilisiert (71), und durch NaCl- bzw. KCl-Konzentrationen über 300 mM wird die innere Zellkernmembran in kleine Vesikel fragmentiert (72). Durch saline EDTA-Lösung konnte deshalb die innere Zellkernmembran von dem Chromosomenmaterial abgetrennt werden.

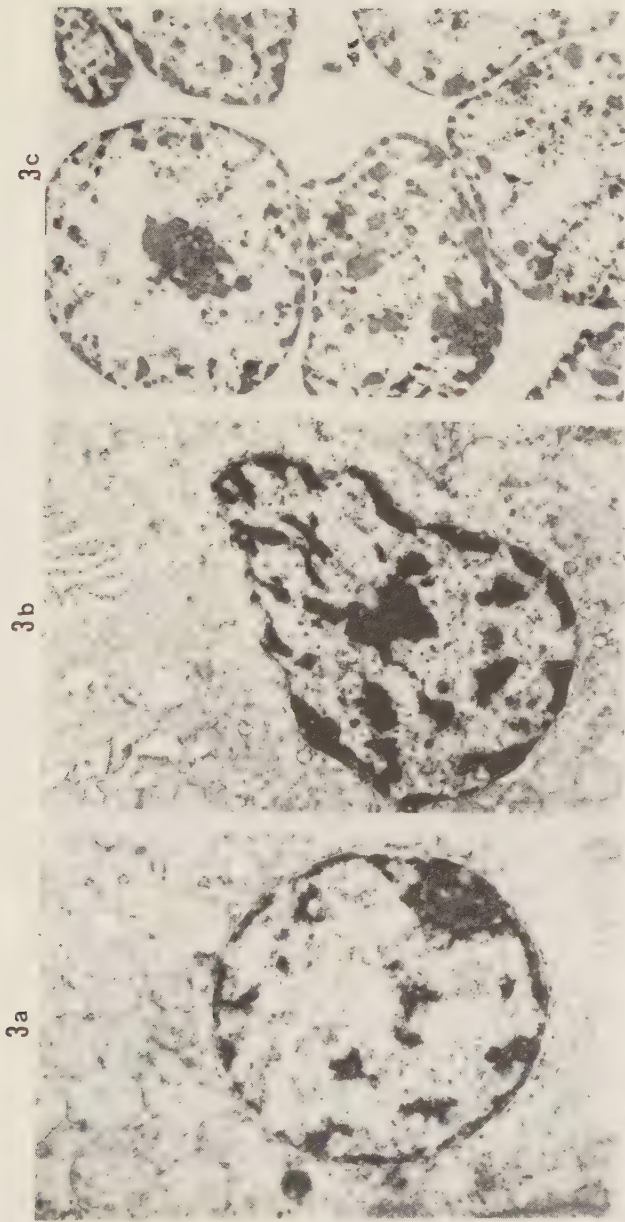


Abb. 3: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von den einzelnen Zellkernreinigungsschritten (siehe Abschnitt 2.4.)

3 a: Zellkerne in 0,25 M Saccharosepuffer, Vergrößerung 7.500 x 3

3 b: Zellkerne nach 0,5 % Triton-X-100 Behandlung, Vergrößerung 7.500 x 3

3 c: Triton-X-100 behandelte Zellkerne nach Zentrifugation über hochmolare Saccharose, Vergrößerung 5.000 x 3

Da unter physiologischen Salzkonzentrationen der Durchmesser der Nukleoproteinfibrille 150 - 180 Å beträgt, in Wasser aber auf 250 - 280 Å anschwillt (73), wurde dieser Quelleffekt für die Membranfragmentierung benutzt. Die innere Zellkernmembran konnte nach einer Waschprozedur der EDTA-behandelten Zellkerne in einer Reihe von Tris-Puffern abnehmender Ionenstärke und Wasser nahezu vollständig abgetrennt werden, wie aus der elektronenmikroskopischen Aufnahme des Chromatins (Abb. 4) zu ersehen ist.

Da die chromosomalen Fibrillen jedoch an mehreren Punkten mit der Kernmembran verbunden sind (74,75), ist eine geringfügige Membranverunreinigung des Chromatins unvermeidlich.

Weiterhin ist auf der elektronenmikroskopischen Aufnahme (Abb. 4) die perlschnurartige Chromatinstruktur (Nukleosomen) deutlich zu erkennen. Der Durchmesser der sphärischen Partikel beträgt ca. 100 Å und soll jeweils aus einem Doublett der Histone H 2 A, H 2 B, H 3 und H 4 sowie ca. 200 Basenpaaren DNS bestehen (79,103,104).

Aus 3.620 g Kuheutergewebe wurden ca. 250 ml Chromatin und 328 mg DNS gewonnen.

Die Kernproteine, die mit den Informoferen assoziiert sind, wurden nicht analysiert.

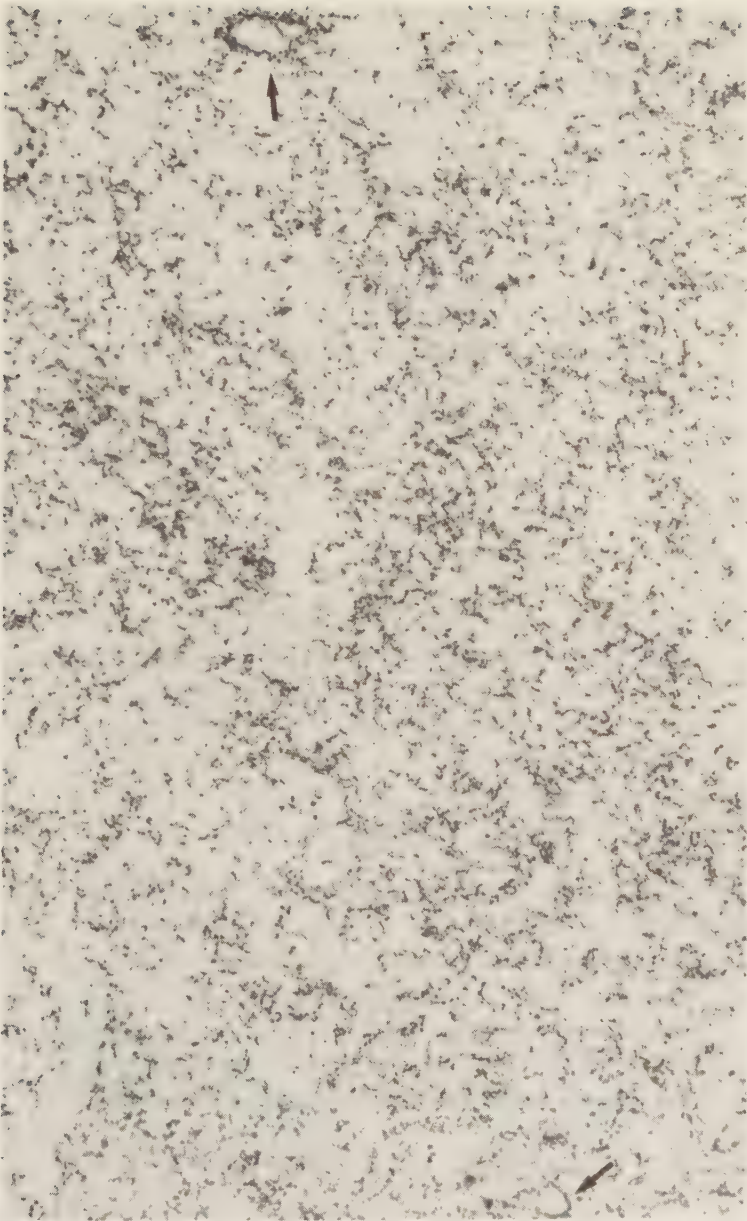


Abb. 4: Elektronenmikroskopische Aufnahme (Vergrößerung 12.000 x 3) von Chromatin.
Die Pfeile deuten auf geringfügige Membranverunreinigungen hin.

3.3. Chromatindissoziation

Veränderliche Parameter für die differentielle Dissoziation des Chromatins waren die Art des dissozzierenden Ions, die unterschiedliche Ionenstärke in den Chromatindissoziationspuffern, die Vorbehandlung des Chromatins durch verschiedene Scherkraftbedingungen und die verschiedenen pH-Werte, bei denen die Dissoziation durchgeführt wurde.

Die Proteinabschälung der Chromatin-DNS geschah in der Weise, daß zunächst ein großes dissozzierendes Ion (Guanidiniumhydrochlorid) für die erste Chromatindissoziationsstufe benutzt wurde. Die experimentellen Befunde von S. Levy et al. (55) deuteten darauf hin, daß in 6 M Harnstoff, 0,35 M Guanidiniumhydrochlorid, 0,1 M Phosphatpuffer pH 7, die Histone abdissozzieren. Aus Tabelle 1 ist zu entnehmen, daß 84,7 % aller chromosomalen Kuheuterproteine unter diesen Bedingungen abdissozzieren.

Nachdem die Chromatin-DNS durch mechanische Scherkräfte zerkleinert wurde, sollten die elektrostatischen Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den restlichen chromosomalen Proteinen und der DNS durch eine hohe Elektrolytkonzentration (3 M NaCl), die Wahl eines kleineren dissozzierenden Ions (Na^+) und die Erhöhung des pH-Wertes auf pH 8,3, unterbunden werden.

Die Harnstoff- (6 M), Proteasehemmer- (1,5 mM NaHSO_3), EDTA- (2 mM) und Dithioerythrit- (2 mM)-Konzentrationen wurden gegenüber dem ersten Dissoziationspuffer nicht verändert. Unter diesen Bedingungen dissozzierten 15,2 % aller chromosomalen Proteine (Tabelle 1). Durch diese beiden Dissoziationsstufen sind alle chromosomalen Proteine von der Chromatin-DNS dissozziert worden. Die langen Zen-

trifugationszeiten in den Chromatindissoziationspuffern (48 bzw. 60 Stunden) waren unbedingt erforderlich, da sonst der Proteinüberstand geringfügig mit Nukleinsäuren verunreinigt war und die weitere analytische Darstellung der NHC-Proteine störte (Aggregation).

Die quantitative Zusammensetzung des Kuheuterchromatins ist auf Abbildung 5 dargestellt.

Die Aminosäurezusammensetzung und das Verhältnis von sauren zu basischen Aminosäuren von beiden Histonfraktionen (0,56 von der 3 M NaCl Dissoziation und 0,53 von der 0,35 M Gua.-Dissoziation) entsprechen den in der Literatur angegebenen Werten für Histonfraktionen von 0,54 (106) und 0,58 (156) (siehe Abschnitt 3.4.9., S. 76)

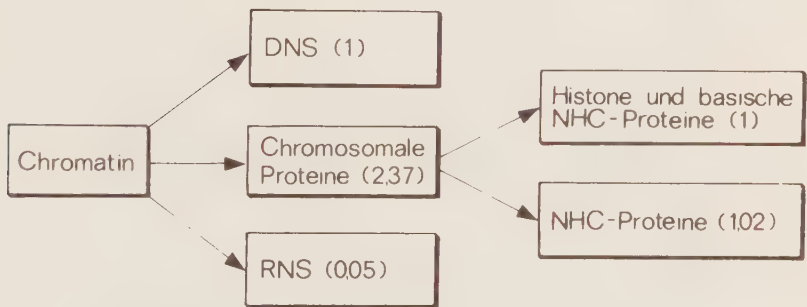


Abb. 5: Bestandteile des Chromatins

Die Zahlen geben die relativen Mengen der Chromatinkomponenten aus Kuheutergewebe an. Mit Hilfe von Bio-Rex 70 Ionen-austauscher- Chromatographie werden die chromosomalen Proteine fraktioniert in Histone und NHC-Proteine. Die Histonfraktion enthält außerdem noch geringe Mengen an basischen NHC-Proteinen. Das Verhältnis von DNS zu Histonen ist 1 : 1.

Tabelle 1: Differentielle Kuheuter-Chromatin-Dissoziation

	DNS	RNS	Kern- proteine	% dissozi- ierte Kern- proteine (100% = 773,3 mg)	Verhältn. Protein : DNS	Verhältn. RNS : DNS	Histone/basi- sche NHC-pro- teine, Eluat vom Bio-Rex 70 Ionenau- tauscher	NHC-Proteine, Filtrat vom Bio-Rex 70 Ionenau- tauscher
Chromatin	328,9 mg	17,9 mg	779,9 mg		2,37	0,05		
0,15 M Gua.- Dissoziation, Überstand	31 µg	0,49 mg	665,6 mg	84,7 %			302 mg	286 mg
0,15 M Gua.- Dissoziation, Sediment	328 mg							
3 M NaCl Dissoziation, Überstand	47 µg	80 µg	117,7 mg	15,2 %			39 mg	62,5 mg
3 M NaCl Dissoziation, Sediment	327 mg							

Gesamtmenge DNS: 328,9 mg
 Gesamtmenge NHC-Proteine: 348,5 mg
 Gesamtmenge Histone/basische NHC-Proteine: 341 mg

3.4. Präparative und analytische Darstellung der Histonfraktionen

Die Trennung der stark basischen (Histone und basische NHC-Proteine) von den übrigen chromosomalen Proteinen mit Hilfe von Bio-Rex 70 Ionenaustauscherchromatographie war unbedingt notwendig, da die Histone und die sauren und neutralen NHC-Proteine unter den Lösungsbedingungen der nachfolgenden isoelektrischen Fokussierung (6 M Harnstoff, 2 mM Dithioerythrit) aggregieren und präzipitieren.

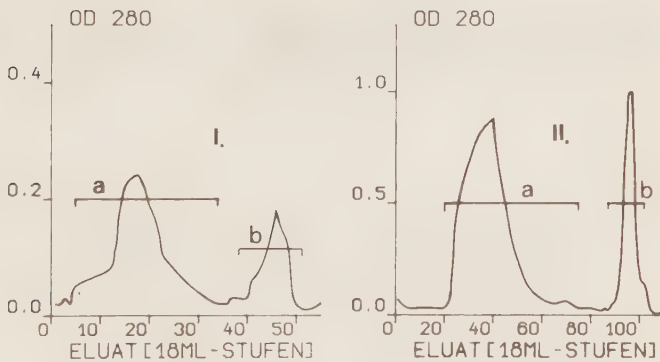


Abb. 6: Chromatographische Auftrennung von Histonen und Nichthistonen mit Hilfe von Kationenaustauscher-Chromatographie über Bio-Rex 70

Die von Bio-Rex 70 nicht adsorbierten, in 0,35 M Guanidiniumhydrochlorid, 6 M Harnstoff, 2 mM Dithioerythrit, 1,5 mM NaHSO_3 , 2 mM EDTA und 0,1 M Phosphatpuffer pH 7 gelösten Proteine (a) wurden als Nichthistonfraktion bezeichnet, die mit 4 M Guanidiniumhydrochlorid, 6 M Harnstoff, 1 mM NaHSO_3 , 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7, Proteine als Histonfraktion (b).

- I. 3 M NaCl dissoziierte chromosomale Proteine aus Kalbsleber
- II. 3 M NaCl dissoziierte chromosomale Proteine aus 15 Tage alten Hühnerembryonenrumpfen.

Die gesamten, stufenlos dissoziierten chromosomalen Proteine (Bedingungen der 3 M NaCl-Dissoziation) aus Kalbsthymus und 15 Tage alten Hühnerembryonemuskelein lassen sich über Bio-Rex 70 in Nichthistonfraktion (a) und Histonfraktion (b) trennen (Abb. 6). Die fünf Histone, die anteilmäßig am stärksten in dieser Fraktion (b) vorkommen, sind elektrophoretisch aufgetrennt worden und auf Abb. 7 zu sehen.

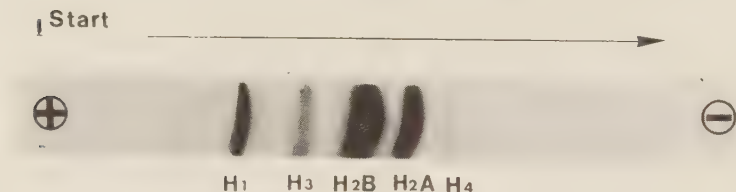


Abb. 7: Kalbsthymus-Histonfraktion der stufenlosen 3 M NaCl Chromatindissoziation, die mit 4 M Guanidiniumhydrochlorid, 0,1 M Phosphatpuffer pH 7 von dem Bio-Rex 70 Ionenaustauscher eluiert wurde und nach der Methode von Panyim und Chalkley (98) in 15 % Polyacrylamid, 2,5 M Harnstoff pH 2,7 wie im Abschnitt "Methoden" beschrieben, elektrophoretisch aufgetrennt wurde.

In beiden differentiell dissoziierten chromosomalen Proteinfractionen (0,35 M Gua. und 3 M NaCl-Dissoziation) aus dem Kuheuter sind basische Proteine vorhanden (Histone und basische NHC-Proteine), die unter den angegebenen experimentellen Bedingungen von dem Ionenaustauscher Bio-Rex 70 adsorbiert werden (Abb. 8).

Die Löslichkeit der Histonfraktion in 7 M Harnstoff, 2 mM Dithioerythrit, ist abhängig von der Vorbehandlung. Fällt man die Histonfraktion nicht mit Alkohol-Äther aus, wie unter 2.7. beschrieben, sondern mit 4 M Ammoniumsulfat, so

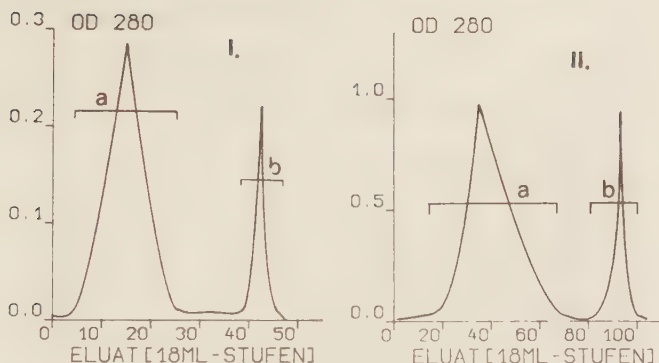


Abb. 8: Chromatographische Auftrennung von Histonen und Nichthistonen mit Hilfe von Kationenaustauscher-Chromatographie über Bio-Rex 70

I. 0,35 M Gua. dissoziierte chromosomale Proteine aus Kuheuter;

II. 3 M NaCl dissoziierte chromosomale Proteine aus Kuheuter.

Die von Bio-Rex 70 nicht adsorbierten, in 0,35 M Guanidiniumhydrochlorid, 6 M Harnstoff, 2 mM Dithioerythrit, 1,5 mM NaHSO_3 , 2 mM EDTA und 0,1 M Phosphatpuffer pH 7 gelösten Proteine (a) wurden als Nichthistonfraktion bezeichnet; die mit 4 M Guanidiniumhydrochlorid, 6 M Harnstoff, 1 mM NaHSO_3 , 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,1 Proteine als Histonfraktion (b).

lösen sich die Proteine nicht mehr in 7 M Harnstoff und 2 mM Dithioerythrit.

Die quantitativen Mengen der präparativ dargestellten und von Bio-Rex 70 adsorbierten basischen, chromosomalen Proteine sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

Ca. 47 % aller chromosomalen Proteine der 0,35 M Gua. Dissoziation werden vom Bio-Rex 70 Ionenaustauscher adsorbiert und sind somit basisch, während es bei der 3 M NaCl-Dissoziation nur ca. 38 % sind.

Tabelle 2: Histonfraktion aus dem Kuheuter

Gesamtmenge: 341 mg $\pm$ 43,7 % von ges. Kernproteinen			
Bio-Rex 70 Eluat	mg	% von ges. bas. Kernproteinen	Bandenzahl
der 3 M NaCl dissoziierten Kernproteine	39	11,4	13
der 0,35 M Gua. dissoziierten Kernproteine	302	88,5	16

Die zweidimensionale gelelektrophoretische Auftrennung der 0,35 M Gua.-Histonfraktion ist auf Abb. 9 und Abb. 11 zu sehen. Gegenüber der eindimensionalen SDS-Gelelektrophorese ist eine wesentlich bessere Auftrennung erreicht worden. Die Histonfraktion der 0,35 M Gua.-Dissoziation ist mit zwei verschiedenen Elektrophoresepuffersystemen zweidimensional dargestellt worden (s. Abb. 9 und Abb. 11).

Auf dem überladenen Gel (Abb. 11) sind ca. 16 Proteinkomponenten verschiedener Mobilität zu sehen. Fünf Proteinkomponenten sind in relativ großer Menge vorhanden, 8 Komponenten sind in geringer Menge vorhanden, 3 Komponenten nur in Spuren. In Abb. 9 sind die gleichen Proteine mit einem anderen Puffersystem aufgetrennt worden. Das Gel wurde nicht überladen. Die 5 basischen Proteinkomponenten sind deutlich zu unterscheiden.

12 verschiedene basische Proteine der 3 M NaCl Dissoziation haben ein Molekulargewicht zwischen 10.000 und 20.000, ein Protein hat ein wesentlich höheres Molekulargewicht (Abb. 10).

Die Separierung der stark basischen chromosomalen Proteine - von den übrigen NHC-Proteine (bei 0,35 M Gua. und 3 M NaCl -Diss.) - mit Hilfe von Bio-Rex 70 Ionenaustauscher-Chromatographie war effektiv genug, um visuell sichtbare Aggregate dieser Proteine in 6 M Harnstoff zu unterbinden.

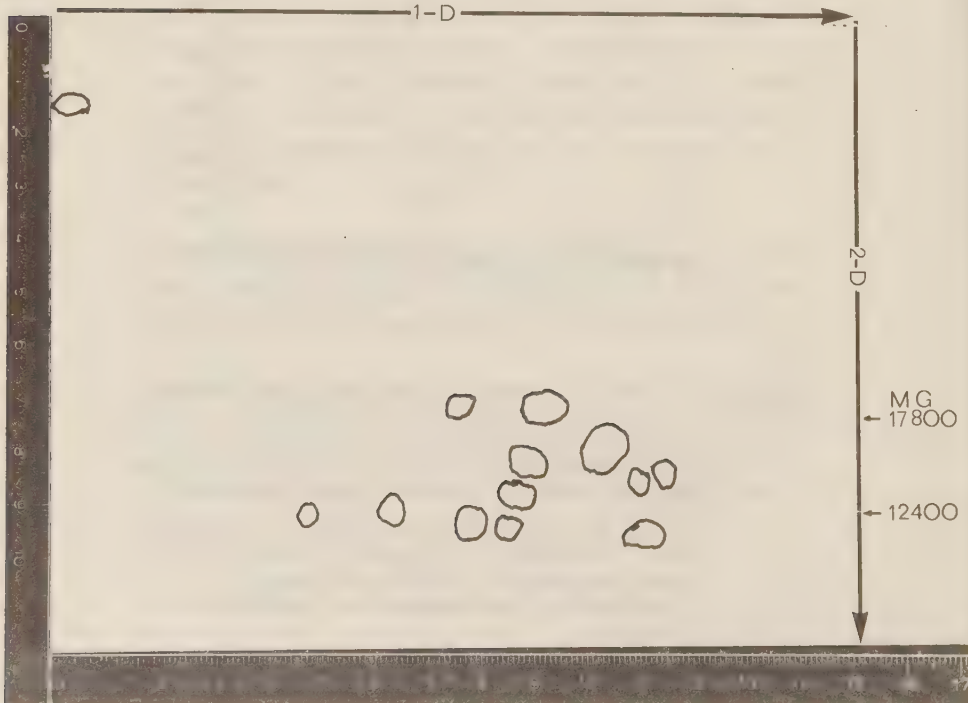
Abb. 10:

Zweidimensionale Gelelektrophorese der 3 M NaCl dissoziierten, Von Bio-Rex 70 adsorbierten Histonfraktionen aus Kuheuter nach A.R. Subramanian in der modifizierten Gelelektrophorese-Apparatur nach E. Kaltschmidt und H.G. Wittmann.

Ca. 0,2mg wurden in der 1. Dimension aufgetragen und mit einem 0,057 M BIS-TRIS/Eisessig-Puffer, pH 5,0, 4 % Acrylamid, 8 M Harnstoff elektrophoretisch getrennt. Der obere Elektrodenpuffer enthält 0,01 M BIS-TRIS/Eisessig, pH 4,0, der untere 0,18 M Kaliumacetat/Eisessig pH 5,4.

Die zweite Dimension wurde durchgeführt mit einem 0,14 M BIS-TRIS/HCl Gelpuffer, pH 6,75, 0,5 % Bisacrylamid, 10 % Acrylamid. Zwischen Plattengel und Rundgel befand sich ein 0,5 cm dickes SDS-Inkubationsgel (0,2 % SDS, 0,14 M BIS-TRIS/HCl pH 6,75, 4 % Acrylamid, 0,1 % Bisacrylamid und 7 M Harnstoff). Der obere Elektrodenpuffer enthält 0,07 M BIS-TRIS/0,07 M MES pH 6,5, 0,01 % Thioglycolsäure und 0,2 % SDS. Der untere Elektrodenpuffer enthielt 0,028 M BIS-TRIS/HCl pH 6,75.

Als Referenzproteine für die Molekulargewichtsbestimmung wurden Cytochrom c (MG: 12.400) und Myoglobin (MG: 17.800) benutzt.



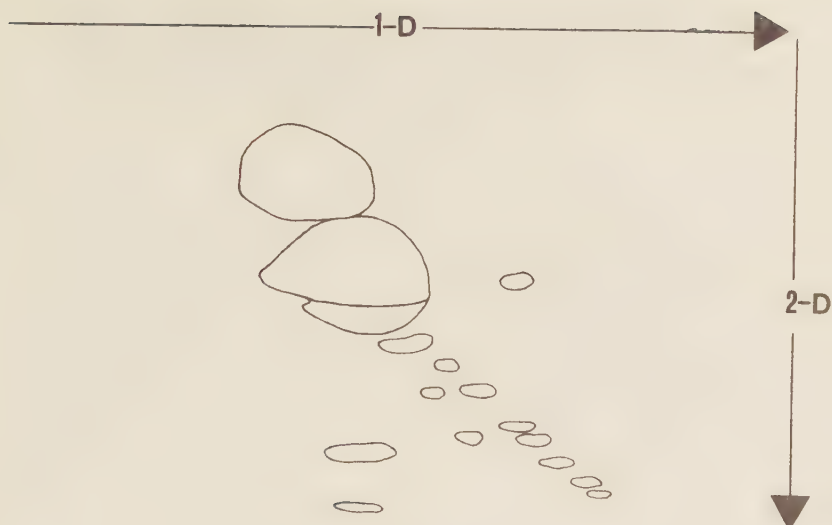


Abb. 11:

Zweidimensionale Gelelektrophorese der 0,35 M Gua. dissoziierten, von Bio-Rex 70 adsorbierten Histonfraktion aus Kuheuter. Die erste Dimension wurde mit 400 μ g überladen und in einem Gelpuffer, bestehend aus 1,8 N Essigsäure, 6 M Harnstoff, 0,3 % Bisacrylamid pH 3,7 und einem Elektrodenpuffer, bestehend aus 0,4 N Essigsäure, 0,03 N Asparaginsäure, durchgeführt. Die zweite Dimension: 0,2 % Bisacrylamid, 18 % Acrylamid, 6 M Harnstoff, Gelpuffer: 0,8 N Essigsäure/KOH pH 4,6, Elektrodenpuffer: Glycin/Essigsäure nach E. Kaltschmidt und H.G. Wittmann (69).

Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 2.10.2.5.

3.4.1. Präparative und analytische Darstellung der NHC-Proteine

3.4.2. Relative NHC-Proteinmengen des Kuheuterchromatins

Die relative Menge der gesamten Kuheuter-NHC-Proteine von der 0,35 M Gua.- und der 3 M NaCl-Dissoziation, die unter den Bio-Rex 70 Äquilibriumspufferbedingungen (0,35 M Guanidiniumhydrochlorid, 6 M Harnstoff, 2 mM Dithioerythrit,

1,5 mM NaHSO_3 , 2 mM EDTA, 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7) nicht adsorbiert werden, beträgt 1,02, bezogen auf die Histongesamtmenge der 0,35 M Gua.- und der 3 M NaCl-Dissoziation (Tabelle 1, S. 48; Abbildung 5, S. 47).

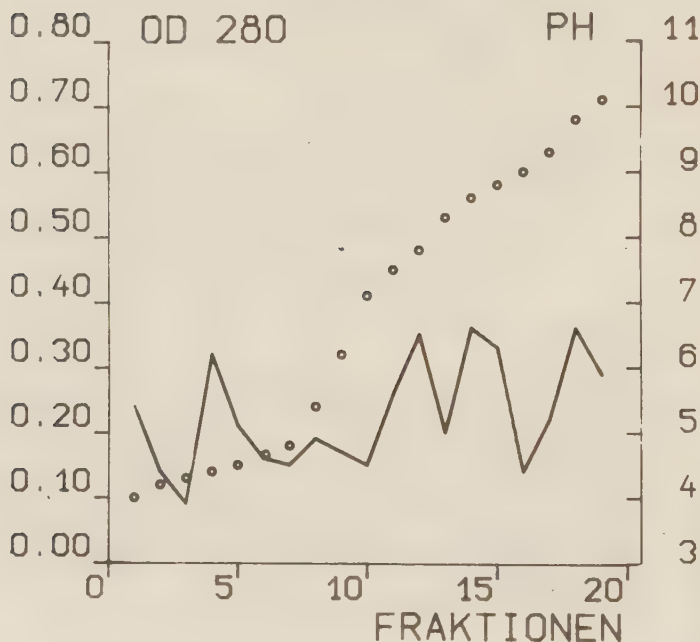


Abb. 12:

Isoelektrische Fokussierung von 9 mg, 3 M NaCl dissoziierten Kalbsthymus-NHC-Proteinen, unter Zusatz von 0,5 % Brij 35, in einer 110 ml LKB-Säule im pH-Bereich zwischen 3 und 10. Bevor die NHC-Proteine auf die Säule aufgetragen wurden, sind die Histone mit Hilfe von Bio-Rex 70 Ionenaustauscher-Chromatographie abgetrennt worden (siehe Abschnitt 2.9.2.).

3.4.3. Präparative Darstellung der Hühnerembryonenmuskel- und der Kalbsthymus-NHC-Proteine durch isoelektrische Fokussierung in der LKB-Säule

Bei allen isoelektrischen Fokussierungen in Saccharose- bzw. Glycerin-stabilisierten pH-Gradienten in LKB-Säulen konnten Proteinpräzipitationen weder durch Zusatz des nichtionischen Detergens Brij 35 (Abb. 12) oder durch Verwendung von organischen Proteinlösungsmitteln (DMSO, Abb. 13), noch durch entsprechende Erniedrigung der aufgetragenen NHC-Proteinmengen (5 mg auf eine 440 ml Säule) verhindert werden. Die Elutionsdiagramme waren deshalb nicht reproduzierbar (Abb. 14 - 16 a).

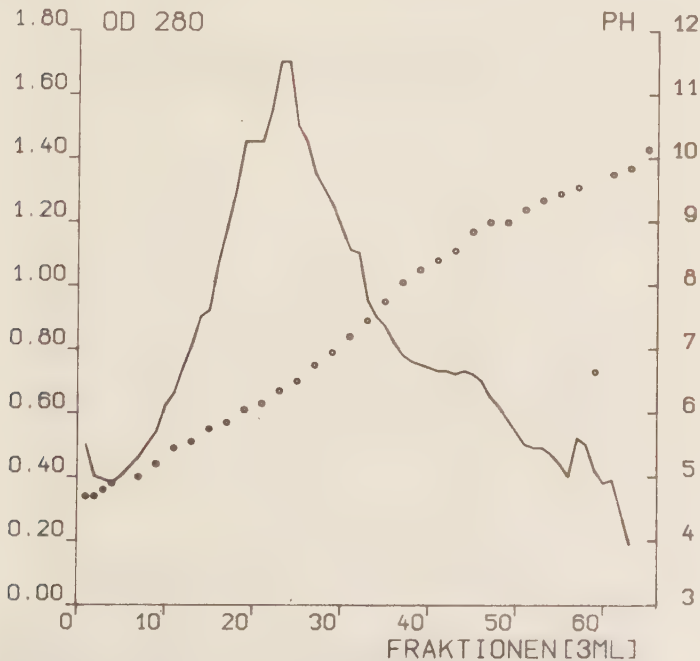


Abb. 13:

Isoelektrische Fokussierung von 12 mg 3 M NaCl dissoziierten NHC--Proteinen aus 15 Tage alten Hühnerembryonenrumpfen in einem Glycerin stabilisierten Gradienten mit DMSO und Harnstoff als Lösungsmittel (siehe Abschnitt 2.9.2.).

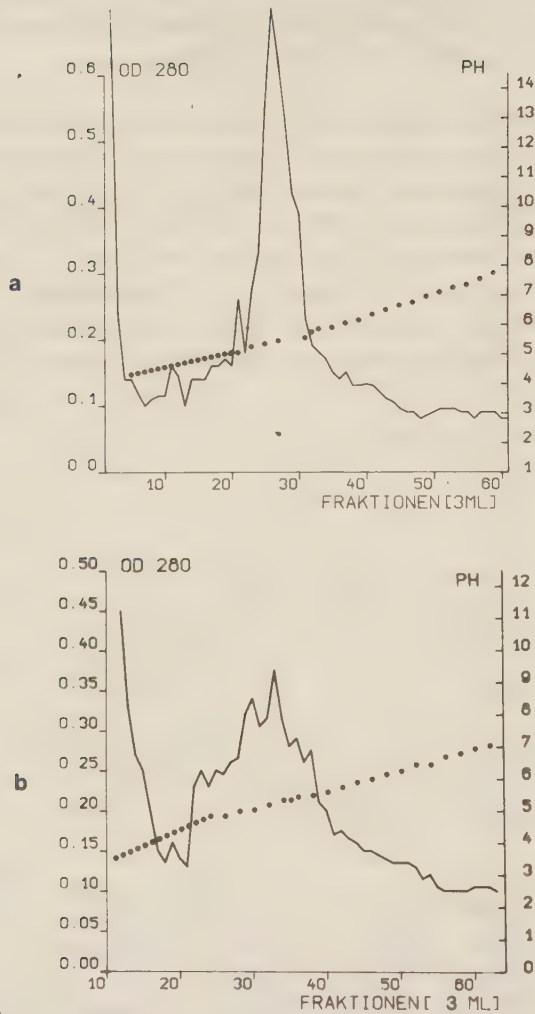


Abb. 14:

Isoelektrische Fokussierung von 3 M NaCl dissoziierten NHC-Proteinen, die aus 14 Tage alten Hühnerembryonenrumpfen isoliert wurden, in einer LKB-Säule im pH-Bereich zwischen 3 - 10. Bevor die NHC-Proteine auf die Säule aufgetragen wurden, sind die Histone mit Hilfe von Bio-Rex 70 Ionenaustauscher-Chromatographie abgetrennt worden (siehe Abschnitt 3.9.2.)

- a) 9 mg NHC-Protein auf 440 ml Säule
- b) 5 mg NHC-Protein auf 440 ml Säule

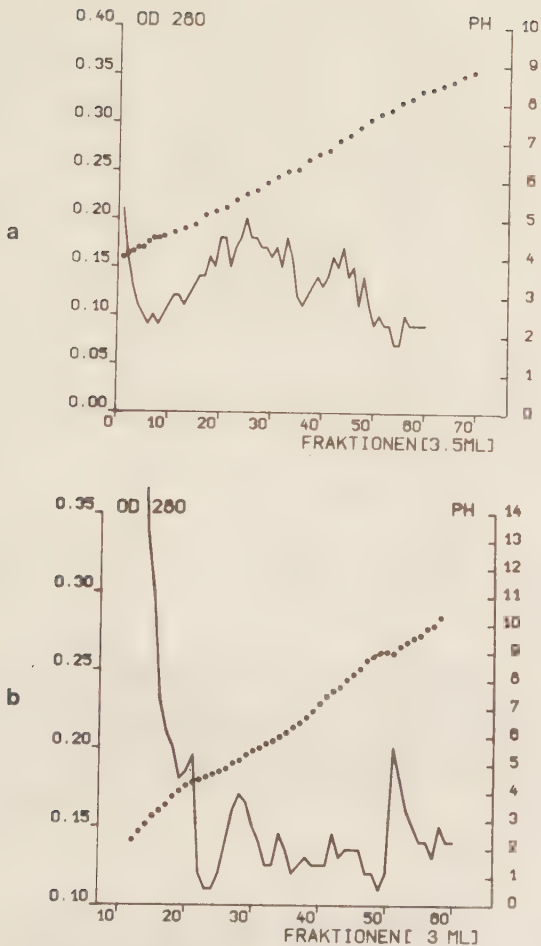


Abb. 15:

Isoelektrische Fokussierung von 0,35 M Gua. dissoziierten NHC-Proteinen, die aus 15 Tage alten Hühnerembryonenrumpfen isoliert wurden, in einer LKB-Säule im pH-Bereich zwischen 3 - 10. Bevor die NHC-Proteine auf die Säule aufgetragen wurden, sind die Histone mit Hilfe von Bio-Rex 70 Ionenaustauscher-Chromatographie abgetrennt worden (siehe Abschnitt 3.9.2.)

a) 9 mg NHC-Protein in 440 ml Säule

b) 5 mg NHC-Protein in 440 ml Säule

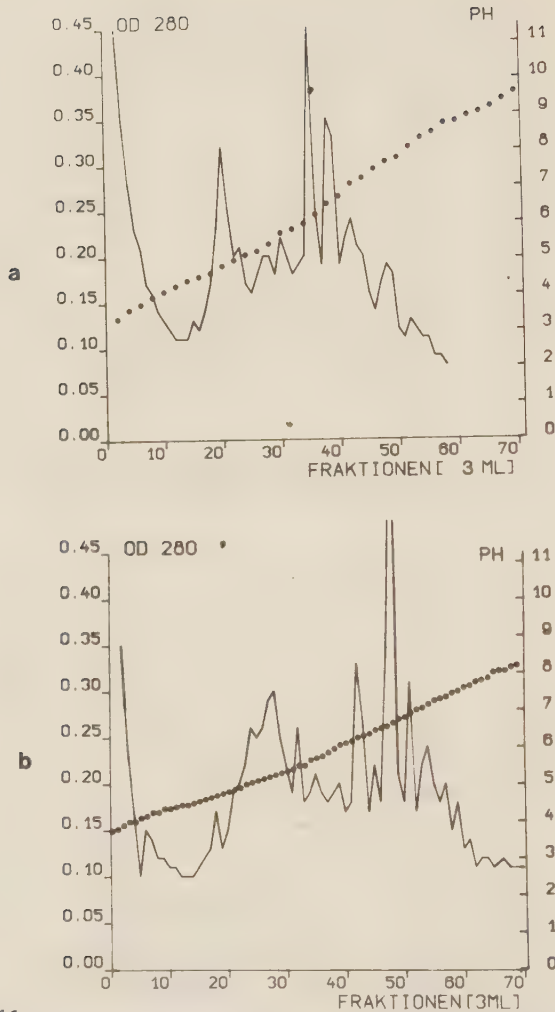


Abb. 16:

Isoelektrische Fokussierung von 3 M NaCl dissoziierten NHC-Proteinen, die aus 15 Tage alten Hühnerembryonenrumpfen isoliert wurden, in einer LKB-Säule im pH-Bereich zwischen 3 - 10. Bevor die NHC-Proteine auf die Säule aufgetragen wurden, sind die Histone mit Hilfe von Bio-Rex 70 Ionenaustauscher-Chromatographie abgetrennt worden (siehe Abschnitt 3.9.2.).

- a) 18 mg NHC-Protein auf 440 ml Säule
- b) 18 mg NHC-Protein auf 440 ml Säule

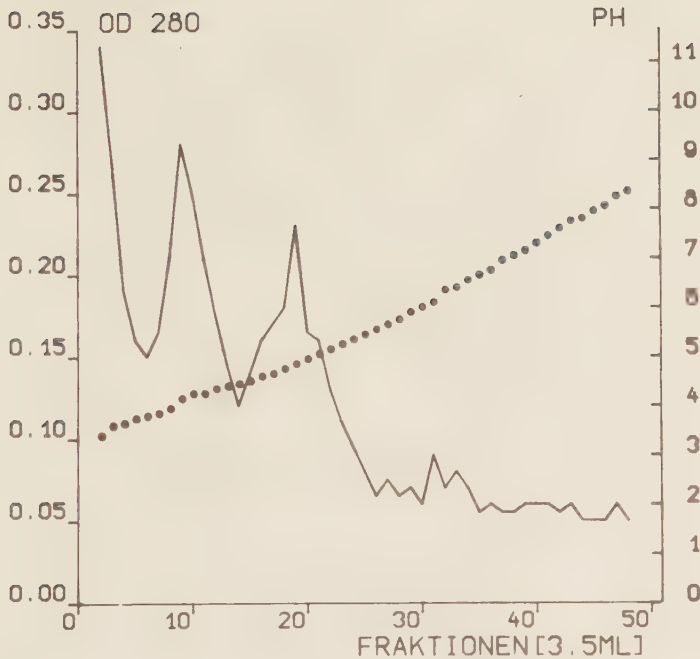


Abb. 16 a:

Isoelektrische Fokussierung in einer 440 ml LKB-Säule im pH-Bereich zwischen 3 - 10 von 8 mg 3 M NaCl dissoziierten NHC-Proteinen, die aus 15 Tage alten Hühnerembryonenrumpfen isoliert wurden. Bevor die NHC-Proteine auf die Säule aufgetragen wurden, sind die Histone mit Hilfe von Bio-Rex 70 Ionenaustauscher-Chromatographie abgetrennt worden (siehe Abschnitt 3.9.2.).

3.4.4. Präparative Darstellung der Kuheuter-NHC-Proteine In der Valmet-Fokussierapparatur

Die Präzipitation der NHC-Proteine an Ihrem Isoelektrischen Punkt stört den Fraktionierungsprozeß in der Valmet-Apparatur nicht, da Querstege eine Durchmischung der präzipitierten Proteine verhindern (Abb. 1).

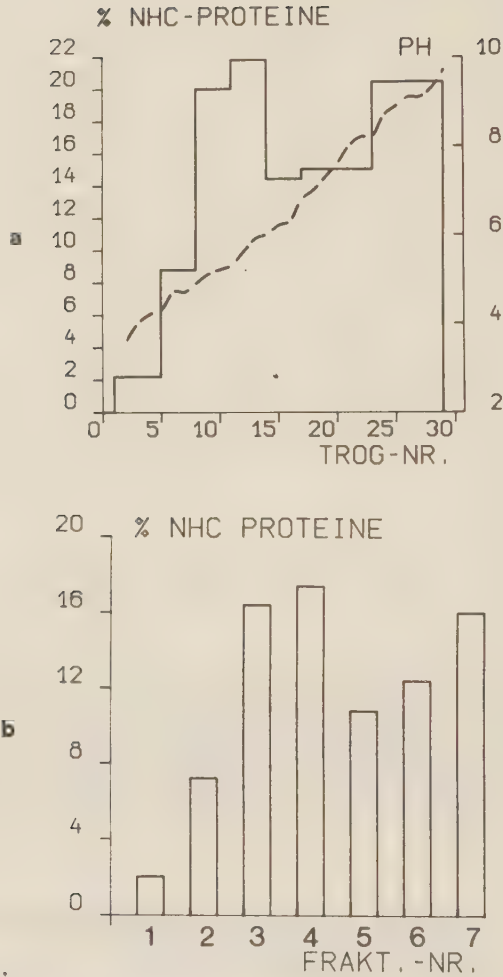


Abb. 17:

Prozentuale Verteilung der 0,35 M Gua. dissoziierten Kuheuter-NHC-Proteine in der Valmet-Apparatur

- a) bezogen auf die 0,35 M Gua. dissoziierten NHC-Proteine
- b) Bezogen auf die gesamten NHC-Proteine

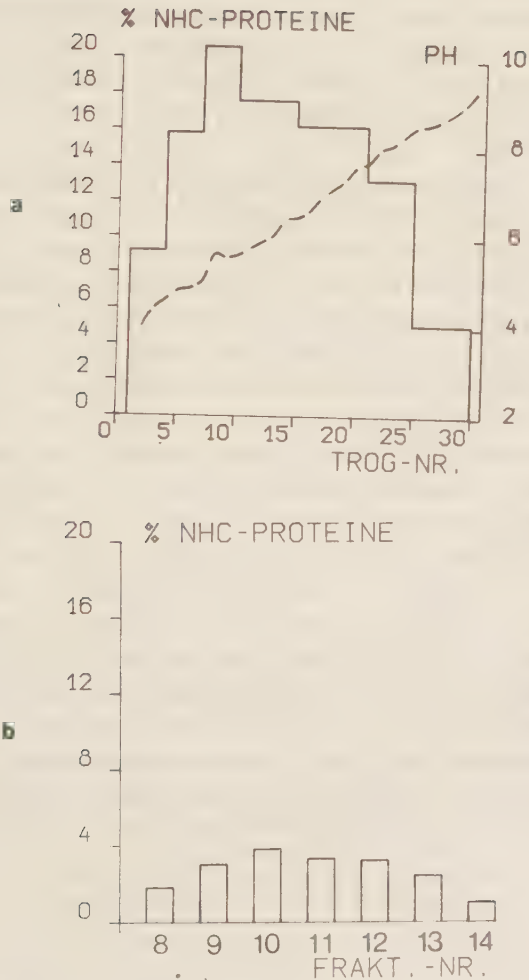


Abb. 18:

Prozentuale Verteilung der 3 M NaCl dissoziierten Kuheuter-NHC-Proteine in der Valmet Apparatur

- a) bezogen auf die 3 M NaCl dissoziierten NHC-Proteine
- b) bezogen auf die gesamten NHC-Proteine

Ein weiterer Vorteil gegenüber der LKB-Säulenfokussierung bestand in den relativ großen Auftragsmengen (ca. 50 mg NHC-Protein), bezogen auf das Füllungsvolumen der Valmet-Apparatur, in denen die Isoelektrische Fokussierung durchgeführt wurde und dem Wegfallen von pH-Gradientenstabilisatorflüssigkeiten (Saccharose, Glycerin).

Dadurch war die Isoelektrische Fokussierung der NHC-Proteine in präparativen Mengen möglich.

Das Fokussierungsdiagramm der 0,35 M Gua. dissoziierten NHC-Proteine (Abb. 17) unterscheidet sich von dem der 3 M NaCl dissoziierten NHC-Proteine in seinem relativ hohen Gehalt an basischen Proteinen (Abb. 18). 20,2 % der 0,35 M Gua. dissoziierten NHC-Proteine fokussieren in einem IP-Bereich zwischen 8,6 und 9,7, demgegenüber haben nur 5,4 % der 3 M NaCl dissoziierten NHC-Proteine einen IP zwischen 8,8 und 9,5. Die Hauptmenge (21 %) der 0,35 M Gua. dissoziierten NHC-Proteine fokussiert in einem IP-Bereich zwischen 5,5 und 5,8. Insgesamt haben ca. 42 % der 0,35 M Gua. dissoziierten NHC-Proteine einen IP zwischen 4,8 und 6,0 (Tabelle 3, S. 71; Abb. 17). Nur 2,2 % der 0,35 M Gua. dissoziierten NHC-Proteine haben einen IP zwischen 3,5 und 4,3. Ähnlich wie bei den 0,35 M Gua. dissoziierten NHC-Proteinen haben die 3 M NaCl dissoziierten NHC-Proteine im Fokussierungsdiagramm (Abb. 18) ein mengenmäßiges Maximum (20,8 %) im IP-Bereich zwischen 5,6 und 5,9. 65,6 % der 0,35 M Gua. dissoziierten NHC-Proteine fokussieren im sauren Bereich, bei den 3 M NaCl dissoziierten NHC-Proteinen sind es 64,3 %.

3.4.5. Zweidimensionale Gelelektrophorese von NHC-Proteinen

Alle zweidimensionalen Acrylamidgelelektrophoresesysteme, bei denen in der ersten Dimension eine Trennung nach Ladung vorgenommen wurde, scheiterten an der partiellen Aggregation der NHC-Proteine im Gel.

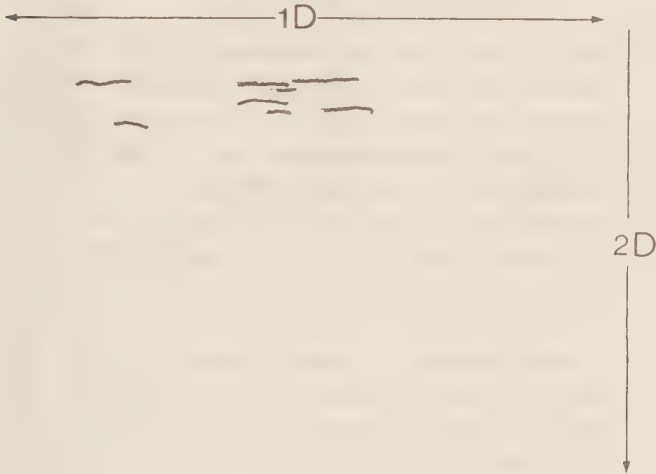


Abb. 19:

Zweidimensionale Acrylamidgelelektrophorese der stufenlos, 3 M NaCl dissoziierten NHC-Proteine aus 19 Tage alten Hühnerembryonemuskeln.

Die NHC-Proteine wurden präparativ vorgetrennt in einer 440 ml LKB-Fokussiersäule zwischen pH 3 und 10. Der Ip-Bereich zwischen pH 5 und 7 wurde gesammelt und in der 2-D-Gelelektrophorese-Apparatur von Desaga in der 1. Dimension nochmals im Gel zwischen pH 5 und 7 fokussiert. In der 2. Dimension (vertikale Richtung) wurden die Proteine in einem SDS-haltigen (0,1 %) Phosphatpuffersystem (0,1 M, pH 7) nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Die perlschnurartigen Proteilmuster sind auf dem Deckblatt nachgezeichnet.

Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 2.10.2.6.:

"Material-Methoden".

Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht in der zweiten Dimension in einem SDS-haltigen Phosphatpuffersystem verlief erfolgreich (Abb. 19).

3.4.6. SDS-Gelelektrophorese der Kuheuter-NHC-Proteinfraktionen im Makrogel

Sowohl von den 0,35 M Gua.- als auch von den 3 M NaCl-dissoziierten Kuheuter-NHC-Proteinen wurden die einzelnen IP-Bereichsfraktionen nach ihrem Molekulargewicht in einem SDS-haltigen Puffersystem aufgetrennt. Bei den langen Laufstrecken (bis zu 19 cm) in dem Makrogel wurde die Bandenschärfe erheblich durch die Diffusion beeinträchtigt, was sich wiederum ungünstig auf die Trennung der NHC-Protein-komponenten mit ähnlichem Molekulargewicht auswirkte (Abb. 20b).

Die Mobilitäten der im Makrogel dargestellten NHC-Protein-Komponenten reichten von ca. 0,1 bis ca. 0,8. Das entspricht einem Molekulargewicht von ca. 10.000 bis ca. 300.000 Dalton (Abb. 20a, S. 67).

3.4.7. Mikrogradientengelelektrophorese

Das höchste Auflösungsvermögen für die analytische Darstellung der NHC-Proteine wurde erreicht durch elektrophoretische Auftrennung über einen kontinuierlichen Gelgradienten der präparativ vorfraktionierten NHC-Proteine in der Valmet-Apparatur (Abb. 22, S. 69, 70; Tabellen 3 und 4, S. 71, 72).

Am optimalsten ließen sich die NHC-Proteine über einen 0 - 40 %igen Gelgradienten auftrennen (Abb. 21 b). Ca. 6 - 8

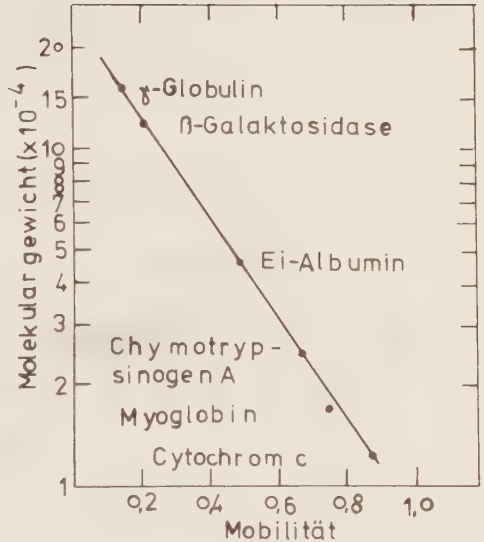
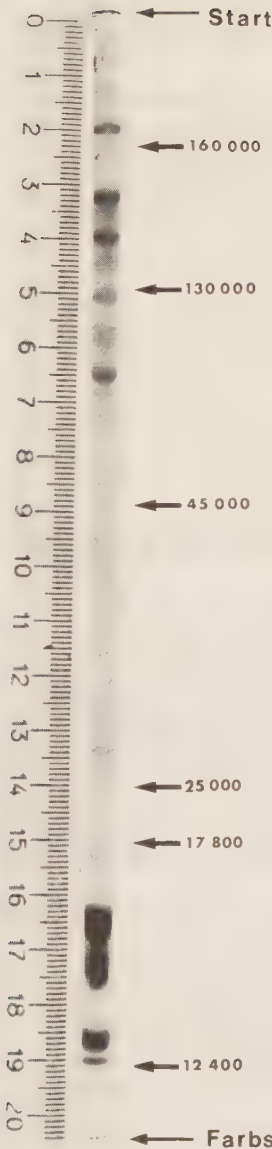


Abb. 20 a:

Darstellung der relativen Wanderungsstrecke (elektrophoretische Mobilität) gegen den Logarithmus des Molekulargewichtes von den Elchproteinen: γ -Globulin (MG: 160.000), β -Galaktosidase (MG: 130.000), Ei-Albumin (MG: 45.000), Chymotrypsinogen A (MG: 25.000), Myoglobin (MG: 17.800) und Cytochrom c (MG: 12.400) in einem SDS-haltigen Puffersystem nach Laemmli (59).

Abb. 20 b:

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli (59) von 0,35 M Gua.-dissoziierten NHC-Proteinen im IP-Bereich zwischen 6,9 und 8,1. Die Molekulargewichte wurden entsprechend der auf Abb. 20 a dargestellten Mobilität von Elchproteinen berechnet. Die Pfeilmarkierungen geben die Molekulargewichte der Elchproteine an.

verschiedene NHC-Proteinkomponenten konnten auf 1 mm Gel-
gradientenstrecke (0 - 40 % Acrylamid) fraktioniert werden.

In einem 0 - 50 %igen Gelgradienten war die Gradientenlänge
wesentlich kürzer als in einem 0 - 40 %igen Gelgradienten.
Niedermolekulare Proteine mit einem Molekulargewicht unter
5.000 können unter den angegebenen experimentellen Bedin-
gungen nicht mit Sicherheit erfaßt werden.

Insulin wandert nach zweistündiger Elektrophorese bei 100 V
durch einen 40 %igen Acrylamidgradienten in den anodischen
Elektrodenpuffer.

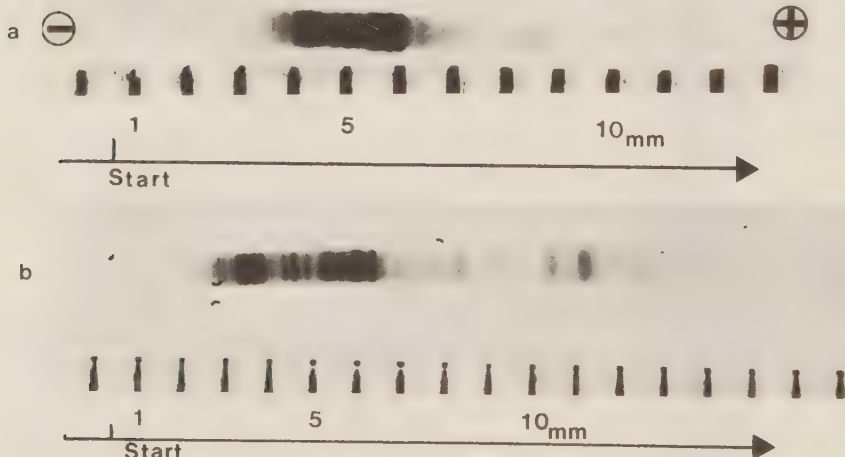
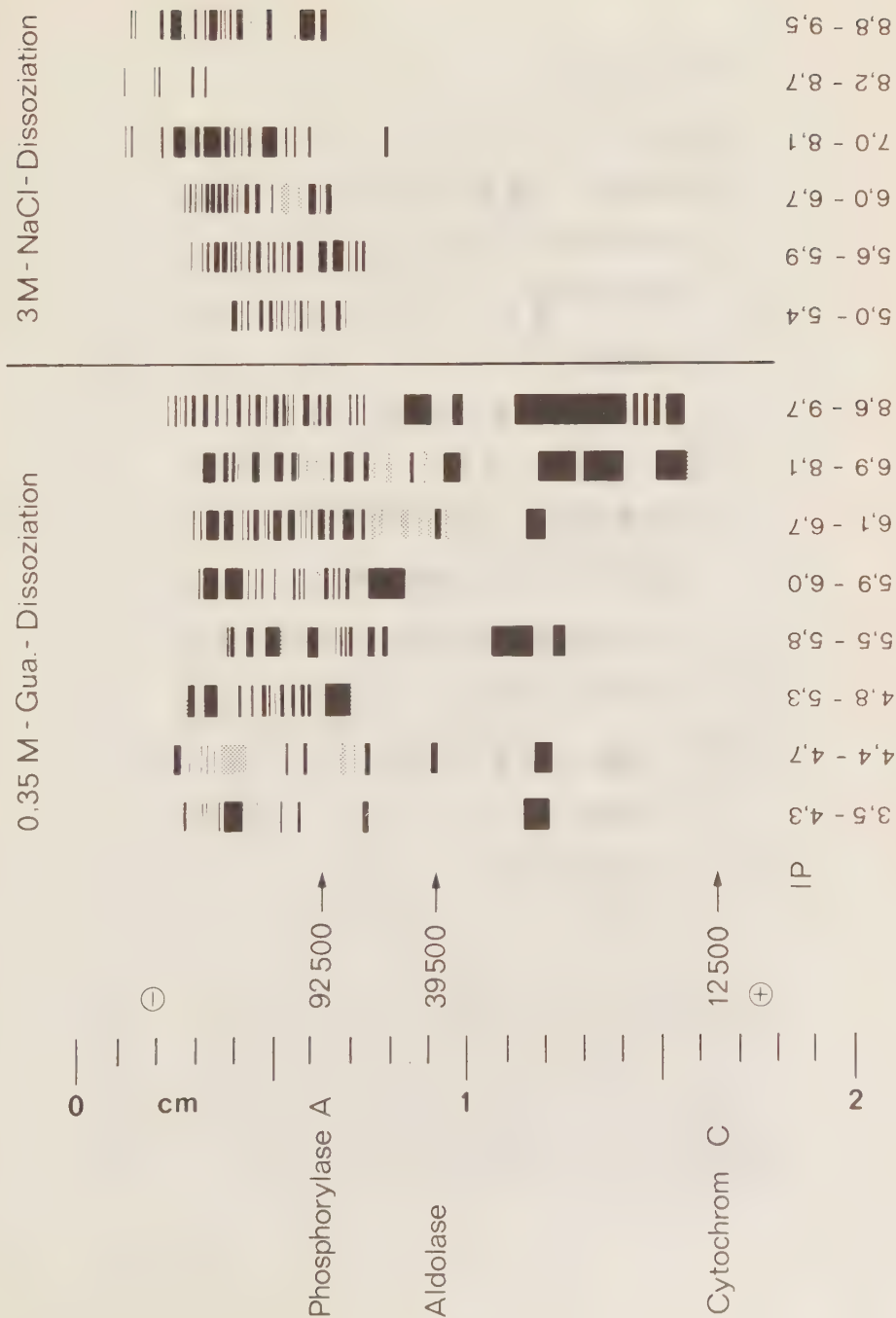


Abb. 21:

- a) Elektrophoretische Auftrennung von 2 µg SDS-beladenen, reduzierten Kuheuter-NHC-Proteinen, IP 6,0 - 6,7 von der 3 M NaCl Chromatindissoziation in einem diskontinuierlichen Puffersystem, 0,05 M Tris/Glycin pH 8,4, 2,8 M Tris/Sulfat pH 8,8 über einen kontinuierlichen Acrylamidgradienten (10 µl Kapillare) von 1 - 50 %. Coomassie-Blaufärbung.
- b) Kontinuierlicher 1 - 40 %iger Acrylamidgradient, sonst gleiche Bedingungen wie unter a.

Abb. 22 a: Visueller Vergleich der auf Abb. 22 b fotografisch dargestellten Heterogenität von den Kuheuter-NHC-Proteinfraktionen



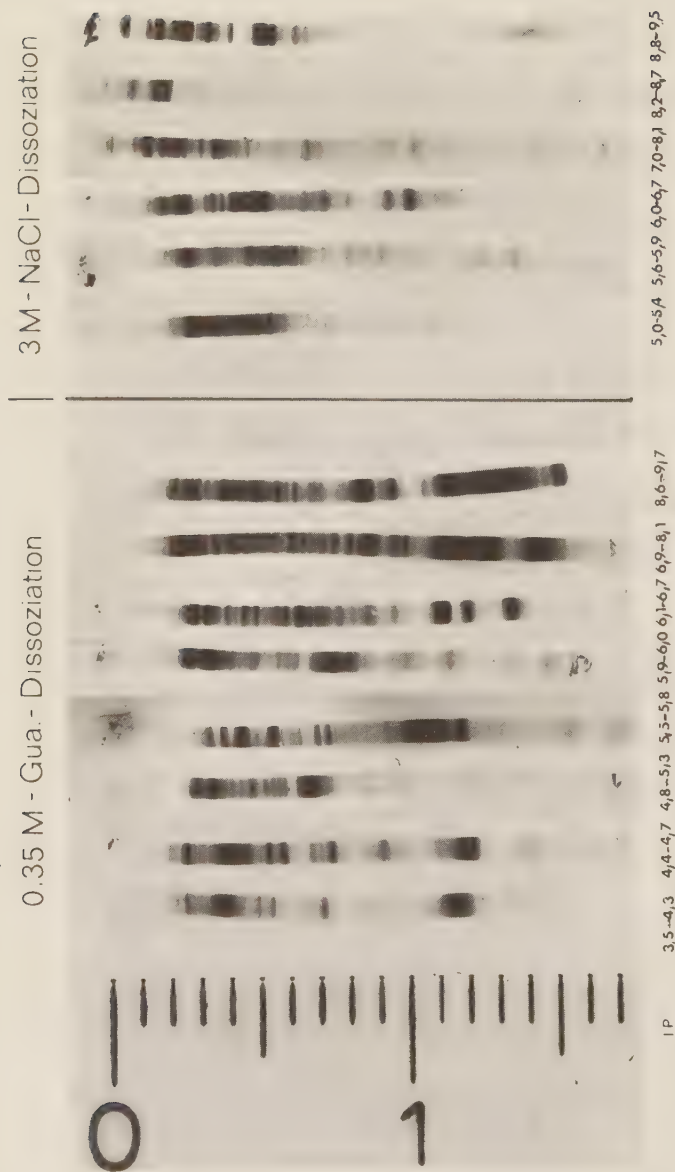


Abb. 22 b: Molekulargewichtsbestimmung im kontinuierlichen Mikrogradientengel (0 - 40 % Acrylamid) von differenziell dissoziierten Kuheuter-NHC-Protetinen verschiedener IP-Bereichsfraktionen in einem SDS-Puffersystem nach V. Neuhoff (94). Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt "Material-Methoden". (2.10.1.1. - 2.10.1.3.)

Tabelle 3

NHC-Proteine der 0,35 M Gua. Dissoziation					NHC-Proteine der 3 M NaCl Dissoziation							
Gesamtmenge: 286 mg $\pm$ 82 % von ges. NHC-Proteinen					Gesamtmenge: 62,5 mg $\pm$ 17,9 % von ges. NHC-Proteinen							
Fraktion	IP	Banden- zahl	Moleku- largew. bereich	% von ges. 0,35 M Gua. den-NHC-Prote- inen	% von ges. NHC-Proteinen	Fraktion	IP	Banden- zahl	Moleku- largew. bereich	Banden- zahl	% von ges. 3 M NaCl den-NHC-Prote- inen	% von ges. NHC-Pro- teinen
1	3,5-4,3	24	>90.000 40.-90.000 10.-40.000	16 5 3	2,2	1,8	9	4,1-4,9	—	—	9,6	1,7
2	4,4-4,7	32	>90.000 40.-90.000 10.-40.000	17 7 8	8,6	7,0	10	5,0-5,4	30	>90.000 40.-90.000 10.-40.000	17 8 5	2,8
3	4,8-5,3	35	>90.000 40.-90.000 10.-40.000	16 7 12	19,7	16,1	11	5,6-5,9	34	>90.000 40.-90.000 10.-40.000	19 9 6	3,7
4	5,5-5,8	39	>90.000 40.-90.000 10.-40.000	18 13 8	21	17,1	12	6,0-6,7	36	>90.000 40.-90.000 10.-40.000	23 9 4	3,2
5	5,9-6,0	38	>90.000 40.-90.000 10.-40.000	17 12 9	—	—	13	7,0-8,1	35	>90.000 40.-90.000 10.-40.000	24 7 4	3,0
6	6,1-6,7	38	>90.000 40.-90.000 10.-40.000	17 12 9	14,1	11,6	14	8,2-8,7	7	>90.000 40.-90.000 10.-40.000	7 — —	2,4
7	6,9-8,1	39	>90.000 40.-90.000 10.-40.000	17 10 12	14,9	12,2	15	8,8-9,5	26	>90.000 40.-90.000 10.-40.000	20 5 1	0,9
8	8,6-9,7	39	>90.000 40.-90.000 10.-40.000	20 10 9	20,2	15,8						

Tabelle 4: Anzahl der visuell detektierten Bandenzahl
in der SDS-Gelelektrophorese
(Mikrogradientengele)

Bandenzahl der gesamten 0,35 M Gua. dissoziierten NHC-Proteine:	273
Bandenzahl der gesamten 3 M NaCl dissoziierten NHC-Proteine:	168
Bandenzahl aller NHC-Proteine:	441
Gesamtbandenzahl aller chromosomalen Proteine:	470

In Tabelle 3 sind die Anzahl der NHC-Proteinkomponenten korrespondierend zu den einzelnen IP-Bereichen dargestellt. 246 NHC-Proteinkomponenten haben ein Molekulargewicht, das größer als 90.000 ist. 111 NHC-Proteinkomponenten haben ein Molekulargewicht zwischen 40.000 und 30.000 und 84 haben ein Molekulargewicht zwischen 10.000 und 40.000. Die 3 M NaCl dissoziierten NHC-Proteine enthalten weniger niedermolekulare (10.000 - 40.000) Proteinkomponenten als die 0,35 M Gua. dissoziierten.

In dem schmalen IP-Bereich von 5,5 - 5,8, in dem 21 % der 0,35 M Gua. dissoziierten Proteine fokussieren, ist die Heterogenität mit 39 NHC-Proteinkomponenten vergleichbar mit der des korrespondierenden IP-Bereiches (IP 5,6 - 5,9, 34 NHC-Proteinkomponenten) der 3 M NaCl dissoziierten NHC-Proteine, in dem gleichfalls ca. 21 % fokussieren. Das Bandenmuster in den beiden Fraktionen ist jedoch unterschiedlich.

Die größte Heterogenität, bezogen auf die Gewichtsmenge der gesamten NHC-Proteine, findet man in einem IP-Bereich von 8,8 - 9,5 der 3 M NaCl dissoziierten NHC-Proteine; 0,9 % der gesamten NHC-Proteine bestehen hier aus 26 verschiedenen NHC-Proteinkomponenten.

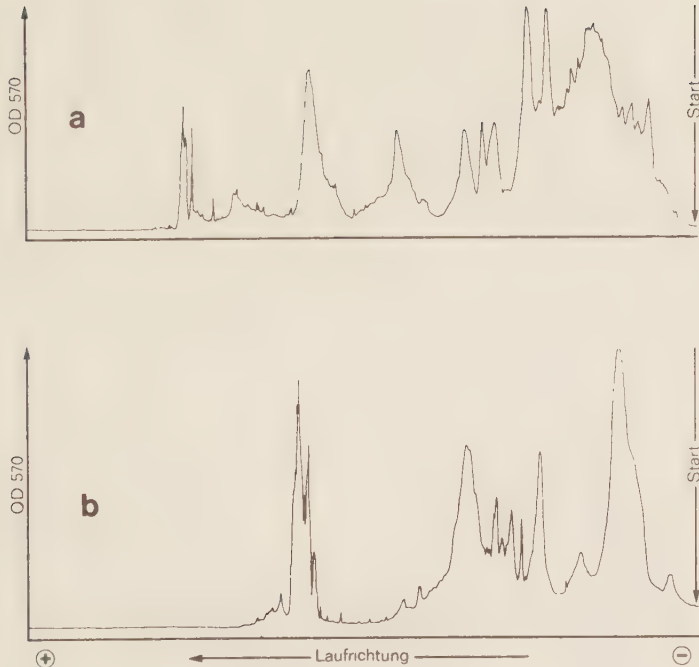


Abb. 23:

Mikrodensitometrischer Vergleich von reduzierten, SDS-be-ladenen, Coomassie Brilliant Blue R 250 gefärbten, NHC-Pro-teinfractionen im Mikrogradientengel (0 - 40 % Acrylamid, 10 μ l Kapillare) in einem 2,8 M Tris/Sulfat Gelpuffer, pH 8,8 und einem 0,05 M Tris/Glycin pH 8,4 Elektrodenpuffer.

Experimentelle Ausführung siehe Abschnitt "Material-Methoden".

- a) ca. 2 μ g Kuheuter NHC-Proteine von der 0,35 M Gua. Dissoziation, IP 4,8 - 5,3
- b) ca. 2 μ g Kuheuter NHC-Proteine von der 0,35 M Gua. Dissoziation, IP 4,4 - 4,7

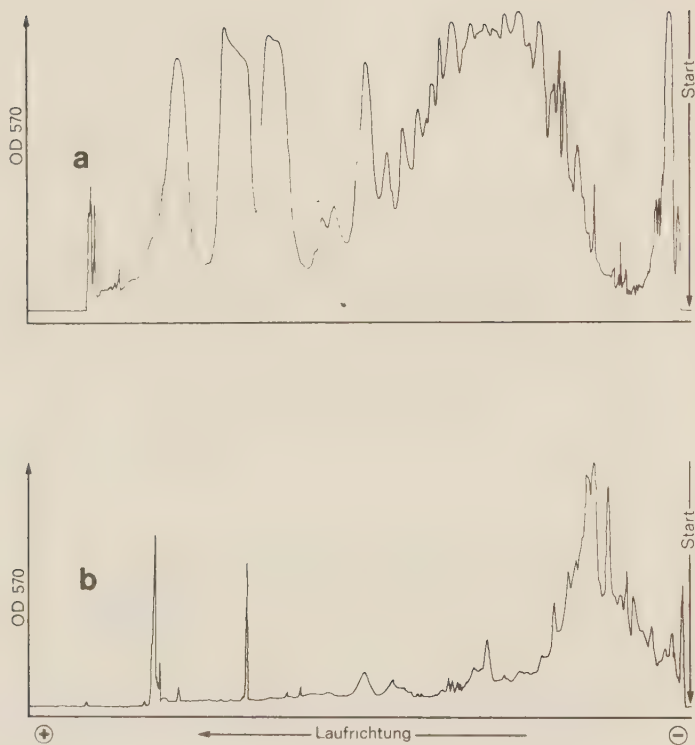


Abb. 24:

Mikrodensitometrischer Vergleich von reduzierten, SDS-be-ladenen, Coomassie Brilliant Blue R 250 gefärbten, NHC-Pro-teinfractionen im Mikrogradientengel (0 - 40 % Acrylamid, 10 μ l Kapillare) in einem 2,8 M Tris/Sulfat Gelpuffer, pH 8,8 und einem 0,05 M Tris/Glycin pH 8,4 Elektrodenpuffer.

Experimentelle Ausführung siehe Abschnitt "Material-Methoden".

- a) ca. 2 μ g Kuheuter NHC-Proteine von der 0,35 M Gua. Dissoziation, IP 6,9 - 8,1
- b) ca. 1 μ g Kuheuter NHC-Proteine von der 0,35 M Gua. Dissoziation, IP 6,1 - 6,7

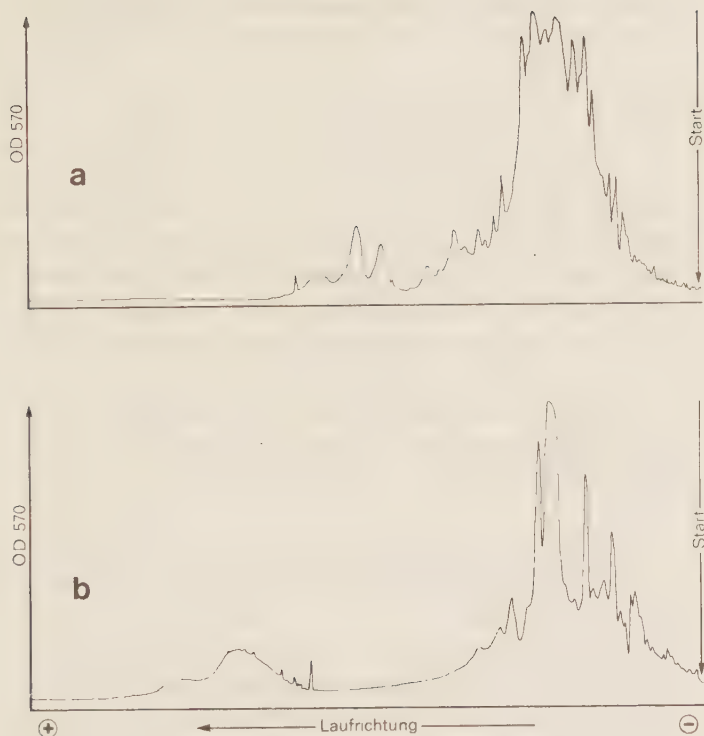


Abb. 25:

Mikrodensitometrischer Vergleich von reduzierten, SDS-beladenen, Coomassie Brilliant Blue R 250 gefärbten, NHC-Proteinfraktionen im Mikrogradientengel (0 - 40 % Acrylamid, 10 μ l Kapillare) in einem 2,8 M Tris/Sulfat Gelpuffer, pH 8,8 und einem 0,05 M Tris/Glycin pH 8,4 Elektrodenpuffer.

Experimentelle Ausführung siehe Abschnitt "Material-Methoden".

- a) 2 μ g Kuheuter NHC-Proteine von der 3 M NaCl-Dissoziation, IP 6,0 - 6,7
- b) 2 μ g Kuheuter NHC-Proteine von der 3M NaCl-Dissoziation, IP 5,6 - 5,9

Die Verschiedenartigkeit der NHC-Proteinkomponenten von benachbarten IP-Bereichsfraktionen innerhalb der 0,35 M Gua.- und der 3 M NaCl-Dissoziation ist mit Hilfe eines mikrodensitometrischen Vergleichs auf Abb. 23, 24, 25 dargestellt. Eine Überlappung der Proteinkomponenten von benachbarten IP-Bereichsfraktionen ist unwahrscheinlich.

3.4.8. Elektrophoresepuffersysteme für NHC-Proteine

Alle ausprobierten Elektrophoresepuffersysteme (s. Abschnitt Methoden, 2.10.1.4. - 2.10.1.7.) scheiterten daran, daß die NHC-Proteine nicht in das Mikrogel eindringen - wahrscheinlich wegen der Proteinaggregation - und eine zweidimensionale Mikrogelelektrophorese damit nicht möglich war.

Die Aggregation der NHC-Proteine im Gel konnte auch nicht durch Fluoreszenzmodifikation der ϵ -Aminogruppen mit Fluoram verhindert werden.

3.4.9. Aminosäureanalyse der chromosomalen Proteinfractionen

Das Verhältnis von sauren zu basischen Aminosäuren reicht von 3,9 bei den stark sauren NHC-Proteinen und fällt entsprechend den IPs der betreffenden Fraktionen bis 1,0 ab. Die Histonfraktionen haben ein Aminosäureverhältnis von 0,53 und 0,56 (Tab. 5 und 6). Die hydrophoben Aminosäuren Phenylalanin, Leucin, Isoleucin, Valin, Alanin und Prolin sind mit 31 - 38 % an den chromosomalen Proteinfractionen beteiligt.

TABLE 5 Aminosäurezusammensetzung* der chromosomalen Proteinsubfraktionen
von der
0,35 M - G u a . - D i s s o z i a t i o n

Amino Acid	IP:3,5-4,3/IP:4,4-4,7/IP:4,8-5,3/IP:5,5-5,8/IP:5,9-6,0/IP:6,1-6,7/IP:6,9-8,1/IP:8,6-9,7	Bio-Rex Elution**
ASP	12,42 13,47 14,12 10,38 10,91 9,67 9,00 8,02 5,08	
THR	12,62 5,80 5,06 6,23 5,77 5,60 5,16 4,92 6,22	
SER	6,22 6,30 7,91 7,41 6,33 6,67 6,17 5,57 5,87	
PRO	15,26 14,55 17,06 15,17 12,95 13,13 11,80 11,30 8,84	
GLY	5,30 5,40 5,39 5,57 6,47 5,36 6,08 6,30 4,29	
ALA	8,62 9,34 5,65 9,96 10,78 9,55 9,96 11,02 8,17	
VAL	8,78 7,30 10,59 8,20 7,80 8,18 8,91 10,40 10,98	
MET	5,20 6,18 6,14 5,85 5,69 6,15 6,01 5,90 6,15	
ILE	- - - - - 0,81 0,55 - 0,76	
LEU	3,26 3,96 5,75 3,01 4,48 4,33 4,12 4,35 4,68	
TYR	8,28 9,74 7,39 8,53 8,67 9,23 8,96 9,07 7,31	
PHE	2,70 4,33 2,64 2,24 2,82 2,65 2,45 2,19 2,96	
HIS	3,28 4,30 - 3,17 3,56 3,24 3,02 2,23 2,07	
LYS	1,14 0,70 - 1,87 1,60 2,04 1,89 1,88 1,90	
ARG	3,06 3,44 5,29 5,34 5,32 6,46 7,24 9,37 14,05	
	2,82 4,45 6,63 6,16 5,57 6,69 6,96 7,41 9,96	
Saure AS.	17,68 28,02 31,18 25,55 23,86 22,80 20,80 19,32 13,92	
Basische AS.	11,02 8,59 11,92 13,27 12,49 15,19 16,06 18,66 25,91	
Saure AS. Basische AS.	3,94 3,26 2,61 1,92 1,91 1,50 1,29 1,03 0,53	

* Mole / 100 Mole

** Histonfraktion und basische NHC-Proteinfraktion

TABELLE 6
Aminosäurezusammensetzung* der chromosomalen Proteinsubfraktionen
von der

Amino Acid	3 M - NaCl - Dissoziation										Bio-Rex Elution**
	IP: 5,0-5,4	IP: 5,6-5,9	IP: 6,0-6,7	IP: 7,0-8,1	IP: 8,2-8,7	IP: 8,8-9,5					
ASP	11,76	10,43	8,92	6,92	6,02	5,97					5,34
THR	4,90	4,57	4,60	3,04	2,21	2,28					5,98
SER	6,84	7,15	5,81	4,81	4,17	4,59					7,41
GLU	15,13	15,00	12,00	9,69	8,36	8,55					9,17
PRO	6,03	4,88	8,56	11,71	12,36	12,03					4,29
GLY	11,73	13,02	20,90	31,35	36,32	36,25					8,29
ALA	7,69	7,94	8,52	11,72	12,80	13,03					10,66
VAL	5,37	5,05	4,01	2,31	2,23	2,48					5,94
NET	-	-	-	-	-	-					-
ILE	3,88	3,78	2,90	1,94	1,66	1,57					4,64
LEU	8,73	9,31	6,32	4,28	3,22	3,12					7,23
TYR	2,70	2,74	2,08	0,83	-	-					2,84
PHE	3,43	3,00	2,60	1,60	1,38	1,27					2,04
HIS	1,36	1,30	2,06	0,92	0,77	0,78					2,03
LYS	4,64	5,22	4,86	2,87	2,59	2,59					13,76
ARG	5,72	6,51	5,71	5,68	5,47	5,11					9,97
Saure AS.	26,89	25,49	20,92	16,61	14,38	14,52					14,51
Basische AS.	11,72	13,03	12,63	9,47	8,83	8,48					25,76
Saure AS.											
Basische AS.	2,29	1,95	1,65	1,75	1,62	1,71					0,56

* Mole / 100 Mole
** Histonfraktion und basische NHC-Proteinfraktion

4. Diskussion

Ein Fernziel der NHC-Protein-Forschung ist die Identifizierung von regulatorischen Proteinkomponenten. Bevor eine molekularbiologische Funktionszuordnung dieser Proteine erfolgen kann, müssen zunächst die verschiedenen Komponenten der NHC-Proteinfraktionen analysiert werden. Es stellt sich die Frage nach der Heterogenität der NHC-Proteine. Im Prinzip könnten Tausende von Regulatorproteinen an die Chromatin-DNS assoziiert sein, jedoch fand man eine sehr begrenzte Heterogenität von ca. 10 - 20 NHC-Proteinkomponenten, die nach Elgin und Bonner ca. 50 % der gesamten NHC-Proteinmasse repräsentieren (106). Einige dieser NHC-Proteinhauptkomponenten konnten kürzlich als Actin, Myosin, Tubulin und Tropomyosin identifiziert werden (119, 120), und es ist wahrscheinlich, daß viele Publikationen, die über Entwicklungs-, Gewebs- oder Zellzyklus-spezifische NHC-Proteinmusteränderungen berichteten, in Wirklichkeit nur eine Veränderung der NHC-Proteinhauptkomponenten registrierten. Bis 1975 konnten ca. 100 verschiedene NHC-Proteinkomponenten dargestellt werden (45, 46).

Die in der vorliegenden Arbeit entwickelte Kombination von präparativen und analytischen Fraktionierungsmethoden ermöglicht eine chemische Charakterisierung der NHC-Proteine und eine Aussage über die Vielzahl der NHC-Proteinkomponenten mit konventionellen Proteinanfärbungsmethoden.

Während der Niederschrift dieser Diskussion erschien eine Publikation (109), in der 470 verschiedene NHC-Proteinkomponenten aus ^{35}S Methionin - markierten HeLa Zellen autoradiographisch nachgewiesen wurden. In der vorliegenden Arbeit konnten die Kuheuter-NHC-Proteine präparativ vorfraktioniert werden und insgesamt 470 chromosomale, Coomassie-anfärbbare Proteinkomponenten nachgewiesen werden. Eine

nichtüberlappende Proteinabschälung der Chromatin-DNS durch die differentielle Dissoziation ist nicht ganz auszuschließen. In diesem Fall müßten in den korrespondierenden IP-Bereichen der 0,35 M Gua. und der 3 M NaCl dissoziierten NHC-Proteinfractionen ein gleichartiges Bandenmuster vorhanden sein. Vergleicht man jedoch die IP-Bereichsfraktion 6,9 - 8,1 der 0,35 M Gua. dissoziierten NHC-Proteine mit der IP-Bereichsfraktion 7,0 - 8,1 der 3 M NaCl dissoziierten NHC-Proteine (Abb. 22), so findet man ein völlig verschiedenes Bandenmuster vor.

Manche Banden sind in der Mikrogradientengelelektrophorese so breit, daß sie nicht unbedingt repräsentativ sein müssen für ein Protein. Mehrere Proteine mit einem ähnlichen Molekulargewicht könnten unter einer breiten Bande liegen. Die auf Abb. 22 dargestellte Heterogenität der NHC-Proteine wäre damit zu klein.

Die Kontamination der chromosomalen Proteine durch unspezifische Assoziation cytoplasmatischer Proteine, die während der Aufarbeitungsprozedur geschehen kann, ist ohne Funktions-test der betreffenden Proteine schwierig zu bestimmen. Viele Proteine mögen fakultativ ihre Funktion im Cytoplasma und am Chromatin erfüllen. Es ist bekannt, daß cytoplasmatische Proteine sowohl *in vivo* (108) als auch *in vitro* (109) in den Zellkern wandern und mit dem Chromatin assoziieren.

Die Wirkungsweise von Proteinen im Cytoplasma und am Chromatin ist für Steroidhormon-induzierbares Gewebe beschrieben worden. Die Hormone sind durch spezifische Rezeptorproteine im Cytoplasma gebunden (110). Nach Assoziation einer zweiten Proteinkomponente soll der Komplex in den Zellkern wandern und sich an spezifischen Stellen des Chromatins anlagern.

Die Exponierung von unmarkierten Zellkernen in radioaktiv markiertes Cytoplasma und anschließende Messung der Radioaktivität von Chromatin-gebundenen Proteinen gäbe auch kein eindeutiges Ergebnis über den Anteil der unspezifisch assoziierten cytoplasmatischen Proteinkomponenten, da der spezifische, dynamische Austausch zwischen cytoplasmatischen und chromosomalen Proteinen in vivo durch den Homogenisierungsprozeß in einen unspezifischen Assoziationsprozeß überführt wird. Spezifische Bindungsstellen könnten durch unspezifische Proteinassoziation abgesättigt werden.

Die stufenweise Dissoziation der chromosomalen Proteine wurde im letzten Dissoziationsschritt (3 M NaCl-Dissoziation) durch Scherkraftanwendung beeinflusst. Während solcher Scherprozedur entsteht eine Flüssigkeitsreibung, durch die kovalente Chromatin-DNS-Bindungen gelöst werden und außerdem chromosomale Proteine lateral auf der DNS verschoben werden (111, 105). Die Chromatin-DNS wird in ihrer eingeknäulten Form durch Proteine zusammengehalten. Durch die Scherprozedur sollte sie verlängert werden und die restlichen chromosomalen Proteine dem kleineren Dissoziationsion Na^+ zugänglich gemacht werden.

Nach Anwendung von Scherkräften und Erhöhung der Elektrolytkonzentration (von 0,35 M Guanidiniumhydrochlorid auf 3 M NaCl) dissoziieren 15,2 % der chromosomalen Kuheuter-Proteine von der DNS (siehe Tabelle 1). Wahrscheinlich kommt ein großer Teil der Bindungsenergie dieser stark assoziierten Proteine von der elektrostatischen Anziehung zwischen den negativ geladenen Phosphorsäureesterbrücken der DNS und den positiv geladenen Gruppen der Aminosäureseitenketten von Lysin, Histidin und Arginin.

20,8 % der 3 M NaCl dissoziierten NHC-Proteine haben auch

einen auffallend hohen Gehalt an basischen Aminosäuren, obwohl der IP-Bereich dieser Fraktion zwischen 5,6 und 5,9 liegt.

Die von Bio-Rex 70 adsorbierten basischen chromosomalen Proteine (Histonfraktionen) zeigen - im Gegensatz zu den von Bio-Rex 70 nicht adsorbierten NHC-Fraktionen - bei der 2-D-Auftrennung in der ersten Dimension keine Gelaggregation. Die Heterogenität der Histonfraktionen ist wesentlich kleiner (insgesamt 29 Proteinbanden) als die der NHC-Fraktionen.

Worauf könnte man diese Heterogenität zurückführen? Histone werden postsynthetisch durch Phosphorylierung, Methylierung und Acetylierung modifiziert (161). Es wäre möglich, daß diese kleinen Unterschiede der elektrophoretischen Mobilität von verschiedenen Histonmodifikationen herrühren. Außerdem soll das Histon H1 bis zu 6 Subfraktionen enthalten (164), die sich nur in wenigen Aminosäuren voneinander unterscheiden. Weitere Histonsubfraktionen sind von Wigle und Dixon (Histon T) (165), von Panyim und Chalkley (Histon NF) (166) und von Zweidler für die Histone M 1, M 2, M 3 und M 4 (167), die alle ein Molekulargewicht zwischen 14.000 und 19.000 haben, beschrieben worden.

Histonähnliche basische NHC-Proteine, wie das HMG 1, das HMG 2 (162) oder das in der Histon H 1-Fraktion auftretende "nicking-closing enzyme" (163) (ω -Protein) könnten in dieser Fraktion vertreten sein.

Die optimale 2 D Auftrennung wurde mit dem modifizierten Elektrophorese-Apparat nach E. Kaltschmidt und H.G. Wittmann (Abb. 2) und einem Elektrophoresepuffersystem nach

A.R. Subramanian (139) erreicht. Die Histonfraktionen konnten in der ersten Dimension nicht Isoelektrisch fokussiert werden, da ihr IP oberhalb des pH-Bereiches von Ampholinen liegt.

Die Aminosäureanalyse der 3 M NaCl dissoziierten NHC-Proteine zeigt in den basischen IP-Bereichsfraktionen extrem hohe Glycin-Werte (31,35 - 36,25). Die hydrolytische Zersetzung von Purinen mag den hohen Gehalt an Glycin in der Aminosäureanalyse vortäuschen. Andererseits ähnelt die Aminosäurezusammensetzung dieser Fraktionen von Pro: 11,7 - 12,3, Gly: 31,3 - 36,3 und Ala: 11,7 - 13,0 den Collagenen (Pro: 10,6 - 11, Gly: 30,3 - 34,11, Ala: 8,2 - 9,5) (125). Collagene werden jedoch mit 2,5 M NaCl ausgefällt, während die NHC-Fraktionen mit 3 M NaCl extrahiert werden. Der extrem hohe Gehalt an Aminosäuren (Pro, Gly), die tendenziell eine α -Helix-Struktur verhindern, wäre ein unbekanntes Strukturmerkmal von chromosomalen Proteinen.

Die größte Schwierigkeit bei der präparativen und analytischen Trennung von chromosomalen Proteinen bestand in ihrer Aggregationstendenz mit den Histonen, mit sich selbst und mit Spuren von DNS. Für die zweidimensionale gelelektrophoretische Auftrennung der NHC-Proteine war das ein unüberwindliches Hindernis und konnte auch nicht durch exotische Puffersysteme (siehe Abschnitt 2.10.1.4. - 2.10.1.6.) gelöst werden. Wahrscheinlich sind geringe Spuren von DNS für diese Aggregationstendenz verantwortlich, da nach 5 1 Nukleasebehandlung (aus *Aspergillus oryzae*) die NHC-Proteine im Gel sich fokussieren lassen (109).

Gelangt man mit der beschriebenen Methode in den Nachweisbereich von Genregulatorproteinen?

Wenn die Lac-Repressor-Operator Wechselwirkung eine Orientierung bieten kann für eukaryontische Genregulatorproteine, so müßten bei Lac-Repressor ähnlicher Dissoziationskonstante (10^{-13} , ca. 10 Lac-Repressor Moleküle pro E.coli Zelle (7), mindestens 10^4 NHC-Proteine vom Lac-Repressortyp vorhanden sein, um in ähnlicher Weise wirksam zu werden.

6,4 Picogramm ($6,4 \times 10^{-12}$ g) DNS enthält eine diploide Kuheuterzelle (76). In 328,9 mg Kuheuter-DNS Ausgangsmaterial sind $(3,289 \times 10^{-1}) : (6,4 \times 10^{-12}) = 5,139 \times 10^{10}$ Kuheutergenome enthalten und damit sind auch die DNS-Einzelkopplesequenzen $2 \times 5,139 \times 10^{10}$ mal in 328,9 mg vertreten.

$2 \times 5,139 \times 10^{10} \times 10^4$ NHC-Proteinmoleküle vom Lac-Repressor-Typ sollten im Nachweisbarkeitsbereich der Methode liegen. Nehmen wir an, solch ein NHC-Protein habe ein Molekulargewicht von 10^5 , dann sollten wir aus 328,9 mg Chromatin-DNS Ausgangsmaterial insgesamt ca. $(2 \times 5,139 \times 10^{14} \times 10^5) : (6 \times 10^{23}) = 171,3 \mu\text{g}$ NHC-Proteinspezies vom Lac-Repressor-Typ isolieren können. Diese Menge entspricht ca. 0,05 % der gesamten NHC-Proteine (348,5 mg).

Da die Heterogenität der Proteinbanden in der SDS-Gelelektrophorese nicht die Heterogenität der verschiedenen funktionsfähigen NHC-Proteine widerspiegelt, sondern sich auch auf die mögliche Verschiedenartigkeit der Untereinheiten bezieht, müßte die Nachweisbarkeitsempfindlichkeit noch einmal um den Faktor der Verschiedenartigkeit der Untereinheiten erhöht werden.

Bei einer Auftragsmenge von ca. $2 \mu\text{g}$ in einer $10 \mu\text{l}$ Kapillare und einer Nachweisbarkeitsempfindlichkeit von ca. 0,01 - $0,02 \mu\text{g}$ pro NHC-Proteinbande (91) in einem 40 %igen Mikro-

gradientengel, liegen alle sichtbaren NHC-Proteinbanden der 3 M NaCl-Dissoziation in einem Nachweisbarkeitsbereich von 0,009 % (3×10^{-6} g) bis 0,03 %, diejenigen der 0,35 M Gua.-Dissoziation liegen in einem Nachweisbarkeitsbereich, in dem noch 0,01 % bis 0,1 % der gesamten NHC-Proteine detektiert werden können.

Wie weit reicht die Sensitivität der Methode, bezogen auf die Anzahl der Moleküle einer Proteinkomponente pro Zelle?

Bei der 3 M NaCl dissoziierten IP-Bereichsfraktion 8,8 - 9,5 können ca.

$$\frac{6 \times 10^{23} \times 3 \times 10^{-6}}{5,139 \times 10^{10} \times 10^5} = 350$$

Moleküle einer einzelnen Proteinspezies ($MG \text{ sel } 10^5$) pro haploidem Genom nachgewiesen werden. Es erscheint möglich, die Sensitivität noch einmal um den Faktor 10 zu steigern.

4.1. Theorie der NHC-Proteinfunktionen

Von einem Transkriptionskontrollmolekül werden zwei Eigenschaften gefordert: Es sollte mindestens eine Wechselwirkungsstelle für die DNS besitzen, und es sollte mindestens eine weitere Wechselwirkungsstelle für ein anderes Molekül als DNS besitzen, unter dessen Einfluß sich seine Struktur verändert. Während RNS nur die erste Eigenschaft hat, besitzen Proteine beide Eigenschaften (77).

Auf Abb. 26 ist die hypothetische Wirkungsweise von NHC-Proteinen skizziert worden. NHC-Proteine mögen unterschiedliche Affinitäten zur DNS besitzen und mögen transkribierbare DNS-Teile permanent markieren (5). Bei der Aktivierung von bestimmten Genen müßte eine zweite Modifikation dieses

DNS-Abschnittes eintreten, damit die RNS-Polymerase sich anheften kann. Solch eine Modifikation könnte durch Phosphorylierung von NHC-Proteinen (121) oder auch durch die Assoziation von Stereoidrezeptorproteinen (110) erfolgen, die eine DNS-Konformationsveränderung an dieser Stelle induziert und eine RNS-Polymerasebindung ermöglicht.

Euchromatinspezifische, nukleostereische Proteine (122) könnten eine asymmetrische Transkriptionsschleife (123) markieren. Wenn kein Repressor an der DNS gebunden ist, könnte die Transkription stattfinden und naszierende RNS mit Informomeren assoziieren (124). ω -Proteine könnten "supercoiled" DNS vor der DNS-Replikation entwinden (25).

Nukleosomal organisierte und stark geknäulte DNS mag aus sterischen Gründen DNS-Erkennungsproteinen unzugänglich sein und damit transkriptionsinaktiv (15).

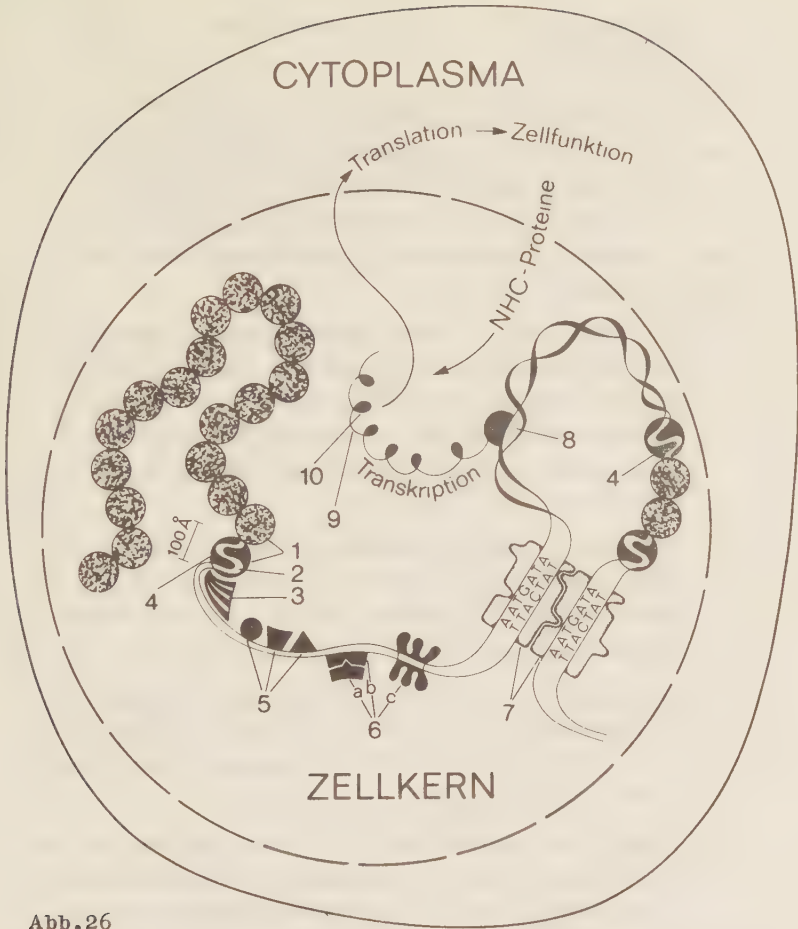


Abb.26

1. Nukleosomen; 2.DNS; 3. ω -Protein (NHC-Protein); 4.Histone;
- 5.Regulatorproteine (NHC-Proteine); 6.Modifikatoren a Effektor-
b Akzeptor; c Repressor- NHC-Proteine; 7.Nukleosomische Proteine (NHC Proteine); 8.RNS-Polymerase (NHC-Protein); 9.Informoferen,
- 10.Informomeren (NHC-Proteine)

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war, eine Methode zu entwickeln, mit deren Hilfe die Vielzahl chromosomaler Proteine präparativ und analytisch dargestellt und chemisch charakterisiert werden könnten. Aufgrund folgender Aufarbeitungsgänge konnten insgesamt 470 chromosomale Proteinkomponenten aus dem Kuheuter nachgewiesen werden:

1. Durch differentielle Zentrifugation wurden Zellkerne aus laktierendem Kuheuter dargestellt. Der Reinheitsgrad der Zellkerne wurde elektronenoptisch kontrolliert. Durch Behandlung mit saliner EDTA-Lösung und sukzessive Erniedrigung der Ionenkonzentration wurde aus den Zellkernen Chromatin gewonnen, das
2. stufenweise in DNS und chromosomale Proteine dissoziiert wurde. Veränderliche Parameter der Dissoziationsbedingungen waren die Ionenstärke, die Art des dissoziierenden Ions, mechanische Scherkräfte und der pH-Wert.
3. Anschließend erfolgte die Separierung der chromosomalen Proteine in stark basische Proteine (Histonfraktion) und in Nichthistone mit Hilfe von Kationenaustauscher-Chromatographie über Bio-Rex 70.
4. Präparative Fraktionierung von den NHC-Proteinen, die nicht von Bio-Rex 70 adsorbiert wurden und Bestimmung des Isoelektrischen Punktes in dem Zonenkonvektionselektrofokussierapparat nach Valmet.
5. Fraktionierung und Molekulargewichtsbestimmung der fokussierten NHC-Proteinfraktionen (1 - 2 μ g) über einen kontinuierlichen Acrylamidgradienten (0 - 40 %) in 10 μ l Kapillaren. 441 NHC-Proteinkomponenten konnten auf diese Weise charakterisiert werden.
6. Zweidimensionale Gelelektrophorese der von Bio-Rex 70 adsorbierten chromosomalen Proteine. 29 basische chromosomale

Proteinkomponenten konnten analytisch nachgewiesen werden.

7. Aminosäureanalyse von allen präparativ dargestellten Proteinfractionen.

Die molekularbiologische Bedeutung der NHC-Proteine wurde diskutiert.

6. Literaturverzeichnis

- 1) H.J. Muller, In: Heritage from Mendel, Hrsg. R.A. Brink, S. 419, University of Wisconsin Press, Madison (1967) 1
- 2) B.J. McCarthy, In: Handbook of Molecular Cytology (A. Lima-de-Faria, Hrsg) Amsterdam: North-Holland (1969)
- 3) G.P. Georgiev, J. Theoret. Biol. 25 (1969) 473
- 4) J. Paul, Nature 238 (1972) 444
- 5) E.H. Davidson und R.J. Britten, Quart. Rev. Biol., 48 (1973) 565
- 6) F. Jacob und J. Monod, J. Mol. Biol. 3 (1961) 318
- 7) W. Gilbert und B. Müller-Hill, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 58 (1967) 2415
- 8) K. Beyreuther, K. Adler, N. Gelsler und A. Klemm, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70 (1973) 3576
- 9) W. Gilbert und A. Maxam, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70 (1973) 3581
- 10) N.M. Malzels, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70 (1973) 3585
- 11) A. MacGillivray, J. Paul und G. Trellfall, Advances in cancer research (Hrsg. S. Weinhouse & G. Klein) Acad. Press, New York, Bd. 15 (1972) 93
- 12) S. Roseman, Chem. Phys. Lipids, 5 (1970) 270
- 13) D. McMahon, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70 (1973) 2396
- 14) J. Sonnenbichler, Naturwissenschaften, 61 (1974) 317
- 15) S. Bram, G. Butler-Browne, P. Bandy und K. Ibel, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72 (1975) 1043
- 16) P.C. Heinrich, G. Raydt, B. Puschendorf und M. Justé, Eur. J. Biochem. 62 (1976) 37 - 43
- 17) T.S. Teng, C.T. Teng und V.G. Allfrey, J. Biol. Chem. 246 (1971) 3597
- 18) J. Paul, Nature New Biol., 239 (1972) 134
- 19) G. Patel, R. Howk und T.Y. Wang, Nature, 215 (1967) 1488
- 20) S.B. Weiss, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 46 (1960) 1020
- 21) D. Gallwitz und I. Sures, Biochim. Biophys. Acta, 263 (1972) 315

- 22) G.P. Georgiev, A.P. Ryskov, Ch. Coutelle, V.L. Mantleva
und E.A. Avakyan, *Biochim. Biophys. Acta*, 259
(1972) 259
- 23) J. Schlepper und R. Knippers, *Eur. J. Biochem.*, 60
(1975) 209
- 24) D.E. Comings und T.A. Okada, *Cold Spring Harbor Symp.*
Quant. Biol. 38 (1973) 145
- 25) D.E. Pulleyblank und A.R. Morgan, *Biochemistry*, 14
(1975) 5205
- 26) J. Paul und R.S. Gilmour, *J. Mol. Biol.* 34 (1968) 305
- 27) R.S. Gilmour und J. Paul, *J. Mol. Biol.* 40 (1969) 173
- 28) W.B. Benjamin und R.M. Goodman, *Science*, 166 (1969) 629
- 29) M. Kamiyama und T.Y. Wang, *Biochim. Biophys. Acta*, 228
(1970) 563
- 30) V.G. Allfrey, C.S. Teng und C.T. Teng, In: *Nucleic acid
protein interaction - nucleic acid synthesis in
viral infection*, Hrsg. D.W. Ribbons, J.F. Woessner
und J. Schultz, North-Holland, Amsterdam (1971) 144
- 31) T.C. Spelsberg, L.S. Hnilca und A.T. Ansevin, *Biochim.*
Biophys. Acta, 228 (1971) 550
- 32) R. Baserga und G. Stein, *Fed. Proc.* 30 (1971) 1752
- 33) M. Kamiyama, B. Bastugue, N. Defer und J. Kruh, *Biochim.*
Biophys. Acta, 277 (1972) 576
- 34) N.C. Kostraba und T.Y. Wang, *Biochim. Biophys. Acta*, 262
(1972) 162
- 35) G.S. Stein, S. Chandhuri und R. Baserga, *J. Biol. Chem.*,
247 (1972) 3918
- 36) D. Rickwood, G. Threlfall, A.J. MacGillivray, J. Paul und
P. Riches, *Biochem. J.*, 129 (1972) 50
- 37) M. Shea und L.J. Kleinsmith, *Biophys. Biochem. Res. Commun.*,
50 (1973) 473
- 38) E.J. DuPraw, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 38
(1973) 87
- 39) S. Elgin, S. Froehner, J. Smart und J. Bonner, *Adv. Cell.*
Mol. Biol., 1 (1971) 1
- 40) W. Beermann, In: *Results and problems in cell differentia-*
tion, Hrsg. W. Beermann, Springer Verlag, New York/
Berlin, 4 (1972) 1

- 41) B.H. Judd und M.W. Young, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 38 (1973) 570
- 42) G.P. Georgiev, A.J. Varshavsky, A.P. Ryskov und R.B. Church, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 38 (1973) 869
- 43) L. Grouse, M.D. Chilton und B.B.M. Carthy, Biochemistry, 11 (1972) 798
- 44) D.E. Kohne und M.J. Byers, Biochemistry, 12 (1973) 2373
- 45) I. Bekhor, J.N. Lapeyre und J. Kim, Arch. Biochem. Biophys., 161 (1974) 1
- 46) I. Bekhor, L. Anne, J. Kim, J.N. Lapeyre und R. Stambaugh, Arch. Biochem. Biophys., 161 (1974) 11
- 47) S.C.R. Elgin, J.B. Boyd, L.E. Hood, W. Wray und F.C. Wu, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 38 (1973) 821
- 48) W.M. Le Sturgeon, W. Wray und H.P. Rusch, Exp. Cell Res., 79 (1973) 487
- 49) L.A. Sanders, Biochemistry, 13 (1974) 527
- 50) A.J. MacGillivray und D. Rickwood, Eur. J. Biochem., 41 (1974) 181
- 51) G. Blobel und V.R. Potter, Science, 154 (1966) 1662
- 52) C. Albrecht und I.M. van Zyl, Exptl. Cell Res., 76 (1973) 8
- 53) O.P. Samarina, E.M. Lukanidin, J. Molnar und G.P. Georgiev, J. Mol. Biol., 33 (1968) 251
- 54) S.L. Graziano und R.Ch.C. Huang, Biochemistry, 10 (1971) 4770
- 55) S. Levy, R.T. Simpson und H.A. Sober, Biochemistry, 11 (1972) 1547
- 56) C.H.W. Hirs, Methods Enzymol. I (1955) 113
- 57) J. Bonner, G.R. Chalkley, M. Dahmus, D. Fambrough, F. Fujimura, R.C. Huang, J. Huberman, R. Jensen, K. Marushige, H. Ohlenbusch, B. Olivera und J. Widholm, Methods Enzymol., 12 B (1968 a) 3
- 58) F. Valmet, Science Tools, 15 (1968) 8
- 59) U.K. Laemmli, Nature, 227 (1970) 680
- 60) E. Kaltschmidt und H.G. Wittmann, Anal. Biochem., 36 (1970) 401
- 61) K. Weber und M. Osborn, J. Biol. Chem., 244 (1969) 4406
- 62) O. Vesterberg, Biochim. Biophys. Acta, 243 (1971) 345
- 63) P. Spitnik-Elson, FEBS Letters, 7 (1970) 214

- 64) M. Ogur und G. Rosen, Arch. Biochem., 25 (1950) 262
- 65) O.H. Lowry, N.J. Rousebrough, A.L. Farr und J.R. Randall,
J. Biol. Chem., 193 (1951) 265
- 66) K. Burton, Biochem. J., 62 (1956) 315
- 67) M.J. Karnovsky, J. Cell Biol., 27 (1965) 137 A
- 68) E.S. Reynolds, J. Cell Biol., 17 (1963) 208
- 69) Z. Dounce und R. Ickowicz, Arch. Biochem. Biophys., 137
(1970) 143
- 70) S. Panyim, R. Jensen und R. Chalkley, Biochim. Biophys.
Acta, 160 (1968) 143
- 71) W.W. Franke, Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat., 105 (1970) 405
- 72) A. Monneron, G. Blobel und E.G. Palade, J. Cell Biol., 55
(1972) 104
- 73) G.W. Bornkamm und J. Sonnenbichler, Chromosoma, 43 (1973) 261
- 74) E.J. DuPrav, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 53 (1965) 161
- 75) D.E. Comings und T.A. Okada, Exp. Cell Res., 62 (1970) 293
- 76) R. Vendrely und C. Vendrely, Experientia, 5 (1949) 327
- 77) A. Gierer, Naturwiss., 54 (1967) 389
- 78) A.S. Douvas, Chr.A. Harrington und J. Bonner, Proc. Nat.
Acad. Sci. USA, 72 (1975) 3902
- 79) R.D. Kornberg, Science, 184 (1974) 868
- 80) B.E. Magun, R.R. Burgess und H.P. Rusch, Arch. Biochem.
Biophys., 170 (1975) 49
- 81) G. Stein, W. Park, C. Thrall, R. Mans und J. Stein, Nature,
257 (1975) 764
- 82) J.D. McGhee und J.D. Engel, Nature, 254 (1975) 449
- 83) C. Newlon, G. Gussin und B. Lewin, Cell, 5 (1975) 213
- 84) A. Riggs, persönliche Mitteilung, zitiert in S.C.R. Elgin,
J.B. Boyd, L.E. Hood, W. Wray und F.C. Wu, Cold
Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 38 (1973) 821
- 85) J.P. Baldwin, P.G. Boseley, E.M. Bradbury und K. Ibel,
Nature, 253 (1975) 245
- 86) D. Rickwood und A.J. MacGillivray, Abstracts, 9th FEBS
MEETING, 1974, Budapest, S. 133
- 87) F.C. Wu, S.C.R. Elgin und L. Hood, J. Mol. Evol., 5 (1975) 87
- 88) S.C.R. Elgin und J. Bonner, Biochemistry, 9 (1970) 4440

- 89) W.T. Garrard, W.R. Pearson, S.K. Wake und J. Bonner,
Biochem. Biophys. Res. Commun., 58 (1974) 50
- 90) A.D. Friesen, J.C. Jamieson und F.E. Ashton, Anal. Biochem.
41 (1971) 149
- 91) R. Rüchel, S. Mesecke, D.I. Wolfrum und V. Neuhoff,
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 355 (1974) 997
- 92) R. Lim und E. Tadayyon, Anal. Biochem., 34 (1970) 9
- 93) D.I. Wolfrum, R. Rüchel, S. Mesecke und V. Neuhoff,
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 355 (1974) 1415
- 94) V. Neuhoff, Molecular Biology Biochemistry and Biophysics,
Bd. 14, Micromethods in Molecular Biology, Springer-
Verlag, Berlin/Heldelberg/New York (1973), S. 4 ff.
- 95) ebd., S. 41 ff.
- 96) G. Braunitzer und G. Bauer, Naturwissenschaften, 54 (1970) 70
- 97) C.W. Cotman und H.R. Mahler, Arch. Biochem. Biophys., 126
(1968) 821
- 98) S. Panyim und R. Chalkley, Arch. Biochem. Biophys., 130
(1969) 337
- 99) J. Bonner, G.R. Chalkley, M. Dahmus, D. Fambrough, F. Fujii-
mura, R.C. Huang, J. Huberman, R. Jensen, K. Marushige,
H. Ohlenbusch, B.M. Olivera und J. Widholm, in:
Methods in Enzymology, Vol. 126 (L. Grossman und K.
Moldave, Hrsg.), Acad. Press, New York (1968)
- 100) J.R. Joice und H.G. Klemperer, Anal. Biochem., 41 (1971) 581
- 101) J.L. Pace, D.L. Kemper und W.L. Ragland, Biophys. Biochem.
Res. Commun., 57 (1974) 482
- 102) A.R. Subramanian, Eur. J. Biochem., 45 (1974) 541
- 103) J.P. Baldwin, P.B. Boseley, E.M. Bradbury und K. Ibel, Nature,
253 (1975) 245
- 104) B. Lewin, Nature, 254 (1975) 651
- 105) D. Doenecke, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 357, (1976) 312
- 106) S. Elgin und J. Bonner, Biochemistry, 11 (1972) 778
- 107) L.S. Hnilica, M.E. McClure und T.C. Spelsberg, in: Histones
and Nucleohistones (D.M.P. Phillips, Hrsg.), Plenum,
New York (1971), S. 187
- 108) E.M. Johnson, R.L. White, D.J. Finnegan und D.S. Hogness,
J. Biol. Chem., 249 (1975) 4990

- 109) J.L. Peterson und E.H. McConkey, J. Biol. Chem., 251
(1976) 548
- 110) B.W. O'Malley und A.R. Means, In: The Cell Nucleus, Vol. 3
Hrsg. H. Busch, Academic Press, New York (1974) S. 379
- 111) M. Noll, J.O. Thomas und R.D. Kronberg, Science, 187
(1975) 1203
- 112) G.H. Dixon, E.P.M. Candido, B.M. Honda, A.J. Lonie, A.R.
MacLeod und M.T. Sung, Ciba Found. Symp., 28 (1975) 229
- 113) J.M. Walker, G.H. Goodwin und E.E. Johns, Eur. J. Biochem.,
62 (1976) 461
- 114) H.P. Vosberg, L.I. Grossmann und J. Vinograd, Eur. J.
Biochem., 55 (1975) 79
- 115) S.C. Rall und R.D. Cole, J. Biol. Chem., 246 (1971) 7175
- 116) D.T. Wigle und G.H. Dixon, J. Biol. Chem., 246 (1971) 5636
- 117) S. Panyim und R. Chalkley, Biochem. Biophys. Res. Commun.,
37 (1969) 1042
- 118) A. Zweidler, unpublizierte Ergebnisse
- 119) A.S. Douvas, C.A. Harrington und J. Bonner, Proc. Nat. Acad.
Sci. USA, 72 (1975) 3902
- 120) W.M. Le Sturgeon, A. Forer, Y.Z. Yang, J.S. Bartram und
H.P. Busch, Biochim. Biophys. Acta, 379 (1975) 529
- 121) A.W. Prestayko, P.M. Crane und H. Busch, Biochemistry, 15
(1976) 414
- 122) D.E. Comings und A.D. Riggs, Nature, 273 (1971) 48
- 123) G.P. Georgiev, persönliche Mitteilung, 1976
- 124) J. Paul und R.S. Gilmour, Ciba Found. Symp., 28 (1975) 181
- 125) R. Timpel, R.W. Glenville, H. Nowack, H. Wiedemann, P.P.
Fietzek und K. Kühn, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.,
356 (1975) 1783

Anmerkung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Molekularbiologie und Biochemie der Freien Universität Berlin in der Arbeitsgruppe Tiedemann und der Arbeitsgruppe Pollow angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. K. Pollow für Anregung und Förderung dieser Arbeit.

Ich danke ferner Herrn Dr. H. Endou von der Universität Tokyo für seine technische Unterstützung bei der Herstellung von Mikrogradientengelen, Herrn Dr. H. Grunz für die Herstellung von elektronenmikroskopischen Aufnahmen und Herrn K. Röding für die Anfertigung von Apparaten.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung.

LEBENS LAUF

Name: Krüger, Christian
geb. am: 2.3.1942
in: Niederwerbig
Eltern: Friedrich Krüger
Elli Krüger geb. Lange
Beruf des Vaters: Pfarrer
Wohnort: 1000 Berlin 41
Grunewaldstraße 27
Schulbildung: Grundschule Germendorf
bis 1956
Mittlere Reife, Schiller-Schule
Berlin-Charlottenburg, 1959
Chemielaborantenlehre an der
Freien Universität Berlin,
1960 -1962
ab 1962 Berliner Abendgymnasium,
Peter A. Silbermann
Abitur im Mai 1963
Studium: 1963/64 Universität Tübingen
Biochemie
Studienprüfung: Vordiplom-Prüfung - 1. Teil:
1964; 2. Teil: 1966
Hauptdiplomprüfung April 1971

Seit September 1971 arbeite ich an der Freien Universität Berlin
am Institut für Molekularbiologie und Biochemie. In der Arbeits-
gruppe Tiedemann war ich bis Dezember 1974 tätig, in der Ar-
beitsgruppe Pollow bin ich seit Januar 1975 wissenschaftlicher
Assistent.

Meine wissenschaftliche Ausbildung verdanke ich den Hochschul-
lehrern:

E. Bayer, E. Bünning, L. Flohé, A. Gierer, M. Hanack, G. Kortüm,
H. Krüger, F. Lingens, K. Mörike, H. Mauser, E. Müller, H. Metzner,
K. Pollow, W. Rüdorff, E. Schütte, F. Schneider, W. Schweizer,
B. Schwemme, H. Tiedemann, W. Voelter, G. Weitzel.

